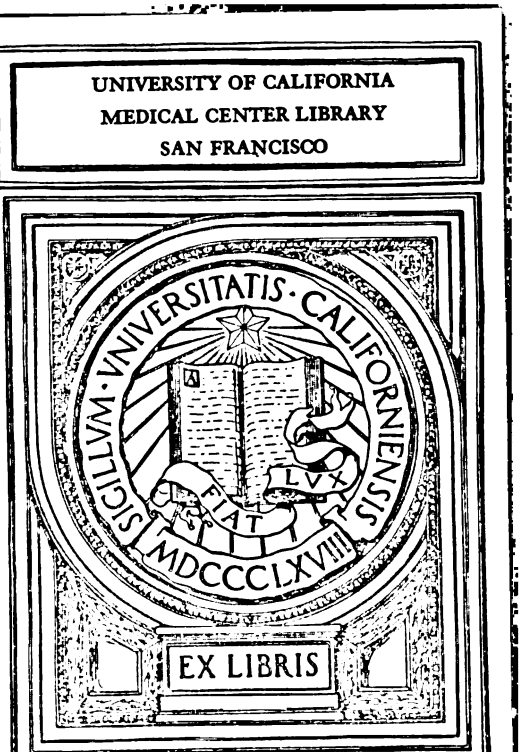
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO



Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, E. J. Lesser-Mannheim, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Liers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Nagoya, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Omelianski-Leningrad, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Freiburg i. Br., O. Warburg-Berlin, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertsiebenundsiebzigster Band

Berlin
Verlag von Julius Springer
1926

Inhalt.

Seite

Bergmann, Max, Arthur Miekeley und **Erich Kann.** Über verschiedene Typen von Aminosäureanhydriden und ihr Verhalten gegen Gerbstoffe und Farbstoffe 1

Iwasaki, Ken. Untersuchungen zur Frage der „Neoglucose" 10

Grafe, V. und **H. Magistris.** Zur Chemie und Physiologie der Pflanzenphosphatide. IV. Mitteilung: Über den Zusammenhang von Vitaminwirkung und Oberflächenaktivität der Phosphatide . . . 16

Barrenscheen, H. K. und **Alfred Eisler.** Beiträge zum Problem des Blutzuckers. II. Mitteilung: Die Kurve der alimentären Hyperglykämie 27

Barrenscheen, H. K., Friedrich Deleschall und **Ludwig Popper.** Beiträge zum Problem des Blutzuckers. III. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 1. Methodik 39

— — — Beiträge zum Problem des Blutzuckers. IV. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 2. Glucose 50

— — — Beiträge zum Problem des Blutzuckers. V. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 3. Fructose und Galaktose . 67

— — — Beiträge zum Problem des Blutzuckers. VI. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 4. Diabetes 76

Barrenscheen, H. K. und **Robert Berger.** Beiträge zum Problem des Blutzuckers. VII. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 5. Insulin 81

Kleinmann, H. Nephelometrische Untersuchungen über fermentative Eiweißspaltung. VI. Mitteilung: Zur Kinetik der tryptischen Spaltung 89

Rona, P. und **H. Kleinmann.** Zur nephelometrischen Methodik der Trypsinbestimmung 107

Henning, Norbert und **Werner Schaefer.** Untersuchungen über Photoaktivität 109

Matsumoto, Buichiro. Über die Wasserstoffionenkonzentration und das Säurebindungsvermögen der Muttermilch bei Säuglingskakke . . 118

Frank, E., M. Nothmann und **E. Hartmann.** Bemerkungen zu der Arbeit von A. Grevenstuk und E. Laqueur: Glykogengehalt der Leber unter Insulinwirkung. II 132

Farkas, G. und **H. Tangl.** Das Verhalten des Farbstoffs im Blute bei entmilzten Hunden 135

Pincussen, Ludwig. Analytische Mitteilungen. V. Über die nephelometrische Bestimmung der Phosphate. Von Franz Juliusburger 140

Löw, A. Zur Methodik der Neutralfettbestimmung im Blute nach Ivar Bang 144

Hessel, Georg. Untersuchungen über das Schicksal des Cadmiums nach parenteraler Einverleibung 146

Ozaki, Junichi. Über den relativen Nährwert der synthetischen Fette 156

Bereseller, L. und **H. Wastl.** Ernährungslehre und Variationsstatistik. I. Mitteilung: Über die chemische Zusammensetzung der Weizenkörner 168

— — Ernährungslehre und Variationsstatistik. II. Mitteilung: Über die Korngröße und das Hektolitergewicht des Weizens 181

— — Ernährungslehre und Variationsstatistik. III. Mitteilung: Über den Cellulosegehalt der Weizenkörner 190

111752

Seite

Glaser, Erhard und **Georg Halpern.** Über Aktivierung von Insulin . . . 196
Kaufmann, E. Die interferometrische Methode der Abderhaldenschen Reaktion und interferometrische Analyse fermentativer Prozesse . 206
Liesegang, Raphael Ed. Die Permeabilität der Kollodiummembranen 239
Forssman, J. Die Abhängigkeit der Wassermannreaktion von den Globulinen 243
Guthier, A. † und **Berta Ottenstein.** Eine Vorrichtung zur Dialyse von leicht oxydablen kolloid-dispersen Systemen 249
Rodina, L. Über die Wechselwirkung der $Na^{\cdot}$-, $K^{\cdot}$- und $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionen in ihrem Einfluß auf das Gewicht der Tiere bei künstlicher Ernährung 253
Galwiato, M. J. Über das Ferment des Menschen- und Pferdeblutes und das Ferment der Keimscheibe des Hühnereies 266
Wladimiroff, G. E. Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. I. Mitteilung: Einige physikalisch-chemische Veränderungen des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier 280
Wladimiroff, G. E. und **A. A. Schmidt.** Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. II. Mitteilung: Zucker-, Rest- und Gesamtstickstoffgehalt im Eiereiweiß sich entwickelnder Hühnereier . . . 298
— — Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. III. Mitteilung: Zucker-, Fett- und Reststickstoffgehalt im Blute des Hühnerembryos 304
Glusmann, M. P. Über die Adsorptionsfähigkeit der Erythrocyten und die Diphtherie-immunität 309
Rippel, August und **Oskar Ludwig.** Untersuchungen über physiologische Gleichgewichtszustände bei Pflanzen. Verlauf der Trockensubstanzerzeugung und Stickstoffaufnahme bei Helianthus annuus L. unter verschiedener Höhe der Stickstoffversorgung 318
Schretter, Gottfried. Der spezifische Brechungszuwachs des Gesamteiweißes im Blutserum 335
— Der spezifische Brechungszuwachs von Serumalbumin und Serumglobulin 349
Fleisch, Alfred. Die Doppelbestimmung als Genauigkeitsmaß bei quantitativen Analysen 375
Täufel, Kurt und **Carl Wagner.** Über die Pufferung in homogenen und heterogenen Systemen 389
Adlersberg, D. und **M. Taubenhaus.** Blutdruck, Blutcholesterin und Diurese nach Zufuhr von Gallensäuren 400
Pringsheim, Hans und **Margot Winter.** Über das Komplement der Amylasen (V) und die Zucker-Eiweißkondensation 406
Niethammer, Anneliese. Zur Frage des Lichttreibens 418
Lenk, Emil. Quantitative Bestimmung der Gelatine 434
Hirai, Kinsaburo. Über die Synthese des d, l-2, 4-Dioxyphenylalanins (d, l-Resorcylalanins) 449
Fleisch, Alfred. Die Genauigkeit der Bangschen Mikro-Blutlipoidbestimmung 453
— Die hormonale Beeinflussung des Blutfettgehalts 461
Warburg, Otto. Über die Wirkung des Kohlenoxyds auf den Stoffwechsel der Hefe 471
Autorenverzeichnis 487

type

Biochemische Zeitschrift

CAL CENTER
JAN 2 1962
San Francisco, 22

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Häggglund-Abo, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, E. J. Lesser-Mannheim, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Nagoya, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Omelianski-Leningrad, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Schemnert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Freiburg i. Br., O. Warburg-Berlin, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, W. Wischowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

177

Hundertsiebenundsiebzigster Band

Erstes bis drittes Heft

Abgeschlossen am 7. Oktober 1926

Berlin
Verlag von Julius Springer
1926

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt ℳ 28,—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als 1½ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Das Honorar beträgt ℳ 40,— für den 16 seitigen Druckbogen.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von 1½ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

177. Band. Inhaltsverzeichnis. Heft 1/3.

Seite

Bergmann, Max, Arthur Miekeley und **Erich Kann.** Über verschiedene Typen von Aminosäureanhydriden und ihr Verhalten gegen Gerbstoffe und Farbstoffe 1

Iwasaki, Ken. Untersuchungen zur Frage der „Neoglucose“ 10

Grafe, V. und **H. Magistris.** Zur Chemie und Physiologie der Pflanzenphosphatide. IV. Mitteilung: Über den Zusammenhang von Vitaminwirkung und Oberflächenaktivität der Phosphatide . . . 16

Barrenscheen, H. K. und **Alfred Eisler.** Beiträge zum Problem des Blutzuckers. II. Mitteilung: Die Kurve der alimentären Hyperglykämie 27

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Über verschiedene Typen von Aminosäureanhydriden und ihr Verhalten gegen Gerbstoffe und Farbstoffe.

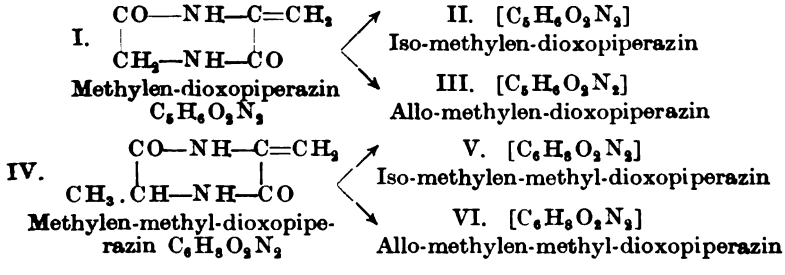
Von

Max Bergmann, Arthur Miekeley und **Erich Kann**[1]).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Lederforschung, Dresden.)

(Eingegangen am 31. Juli 1926.)

Die Existenz der Aminosäureanhydride (Dioxopiperazine) in mehreren desmotropen (bindungsisomeren) Formen ist schon lange vermutet worden[2]). Sie hat sich realisieren lassen an zwei Dioxopiperazinen, die durch Wasserabspaltung aus Glykokoll und Serin bzw. aus Alanin und Serin entstanden gedacht werden müssen. Das Methylen-dioxopiperazin I (aus Glykokoll + Serin entstanden) ließ sich einerseits überführen in Iso-methylen-dioxopiperazin (II), andererseits in Allo-methylen-dioxopiperazin (III) und dieselben Isomerisationen wurden an dem methylreicheren Methylen-methyl-dioxopiperazin IV (aus Alanin + Serin entstanden) durchgeführt:



Diese Iso- und Allopiperazine sind zwar noch aus den wenig umfangreichen Atomgruppen $C_5H_6O_2N_2$ und $C_6H_8O_2N_2$ aufgebaut. Aber diese aufbauenden Gruppen sind durch verhältnismäßig stark entwickelte aggregierende Kräfte untereinander verankert, so daß unsere Iso- und Allopiperazine den Habitus hochmolekularer Stoffe aufweisen.

[1]) XIV. Mitteilung über Umlagerungen peptidähnlicher Stoffe.

[2]) Vgl. z. B. *E. Fischer*, B. **39**, 570, 1906.

Die Feststellung, daß auch eng umgrenzte organische Atomgruppen das Gebahren hochmolekularer Stoffe annehmen können, ist in ihrer allgemeinen Bedeutung für die Chemie der Proteine und für die strukturchemische Erschließung kolloidchemischer Erscheinungen ganz unabhängig von dem speziellen Problem, inwieweit am Aufbau der natürlichen Proteine Dioxopiperazine beteiligt sind. Wesentlicher ist vielmehr, daß theoretische Gesichtspunkte und mancher experimentelle Befund einen Aufbau der Proteine durch Aggregation ziemlich eng umgrenzter Atomgruppen wahrscheinlich machen, wobei die aggregierenden Gruppen durchaus nicht untereinander gleich zu sein brauchen. Unsere Iso- und Allopiperazine sind ein willkommenes Material, die Gesetze derartiger Aggregationen zu studieren. Wir teilen im folgenden einige neue Beobachtungen über die verschiedenen Dioxopiperazinformen mit.

Verfahren zur Umlagerung von Dioxopiperazinen.

Wenn man, wie dies häufig geschehen ist, Bindungsverschiedenheiten innerhalb der Säureamidgruppe (N-Peptidgruppe) von Peptiden oder Dioxopiperazinen zur Erklärung des Aufbaues, der Labilität und des Formenreichtums der Proteine heranziehen will, dann gilt es vor allem, experimentelle Bedingungen für den Eintritt derartiger Bindungsänderungen aufzufinden.

In letzter Zeit sind denn auch von verschiedenen Seiten Versuche angestellt worden, welche eine Umlagerung der Dioxopiperazine durch Erhitzen mit wasserfreiem Glycerin, Diphenylamin oder Anilin auf hohe Temperatur anstreben. So interessante Ergebnisse derartige Versuche auch in den Händen von *Shibata*[1]) und anderen Forschern ergeben haben, so scheint die Reindarstellung derartig isomerisierter Dioxopiperazine bisher doch kaum geglückt zu sein. Vor allem aber kann man einwenden, daß die Brutalität dieser Arbeitsverfahren dem physiologischen Geschehen wenig ähnlich ist und daß dabei unkontrollierbare Aufspaltungen und Synthesen keineswegs so ausgeschlossen sind, wie man vielfach voraussetzt.

Um eine möglichst weitgehende Anpassung an physiologische Verhältnisse zu erzielen, haben wir seit Jahren nach Umlagerungsmöglichkeiten der Dioxopiperazine gesucht, welche allzu hohe Temperaturen vermeiden und auf die Verwendung körperfremder aggressiver Chemikalien verzichten. Es mußte angestrebt werden, in verdünnter wässeriger Lösung und lediglich durch Verschiebung der Aciditäts- bzw. Alkalitätsverhältnisse auf die Struktur der Dioxopiperazine einzuwirken. Schon

[1]) *Keita Shibata*, Acta Phytochimica 2, 39, 1925.

vor 2 Jahren hatten wir festgestellt[1]), daß Methylen-dioxopiperazin (I) durch bloßes Auflösen in Alkalihydroxyd und Wiederausfällen mit Säure in die physikalisch und chemisch ganz davon verschiedene reine Isoform (II) übergeht. Genau so verhält sich das methylreichere Homologe (IV), das dabei in das Isomere V verwandelt wird. Neuerdings haben wir festgestellt, daß der Prozeß anders verläuft, wenn man statt mit Alkalihydroxyden mit schwächer basischen Objekten arbeitet. Beim Methylen-methyl-dioxopiperazin IV genügt z. B. längeres Aufbewahren oder kurzes Erwärmen mit einer verdünnten wässerigen Argininlösung, um die Bildung von beträchtlichen Mengen der Alloform VI zu erreichen. Man erhält dabei die Alloform sogar in besonderer Reinheit, so daß dieses Verfahren zur präparativen Darstellung in Betracht kommt.

0,5 g Methylen-methyl-dioxopiperazin[2]) wurden mit 8 ccm einer 2½proz. wässerigen Auflösung von reinem Arginin im verschlossenen Rohr einige Stunden auf 70 bis 80° erwärmt. Schon nach 1 Stunde begann die klare, etwas gelblich gefärbte Lösung einen farblosen Niederschlag des schwer löslichen Allo-methylen-methyl-dioxopiperazin abzuscheiden, der aus winzigen, oft undeutlichen Nädelchen bestand. Am Schluß wurde abgesaugt und dreimal mit 10 ccm Wasser sorgfältig ausgekocht. Schließlich betrug die Ausbeute noch 0,1 g eines völlig farblosen Präparats.

Zur Analyse wurde bei 78° und 0,5 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet.

5,815 mg Substanz: 11,000 mg CO_2 und 3,130 mg H_2O,
3,360 „ „ „ 0,603 ccm N (23°, 745 mm, 50 Proz. KOH).

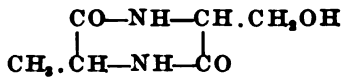
$C_6H_8O_2N_2$ (140,08) Ber.: C 51,40 Proz., H 5,76 Proz., N 20,00 Proz.
Gef.: C 51,59 „ H 6,02 „ N 20,22 „

Beim Aufkochen in warmer überschüssiger n-Natronlauge und nachträglichem Zusatz von Eisessig fiel das Dioxopiperazin in hübschen mikroskopischen Nädelchen aus. Bei der Spaltung mit konzentrierter Salzsäure (D. 1,19) entstand ein Chlorhydrat vom Schmelzpunkt 258°, das nach der Analyse mit dem kürzlich[3]) aus dem Allopiperazin erhaltenen Tetrapeptid-chlorhydrat identisch war ($C_{12}H_{22}O_6N_4Cl_2$. Ber.: N 14,40, gef.: N 14,57). Das Piperazin gab mit Alkali eine farblose, keine gelbe Lösung. Ein Acetylierungsversuch gab keine Acetylaufnahme. Dies alles sind Eigenschaften, wie sie für unser früher auf anderem Wege gewonnenes Allo-methylen-methyl-dioxopiperazin charakteristisch sind.

[1]) H. 140, 128, 1924.
[2]) H. 146, 259, 1925.
[3]) A. 448, 47, 1926.

Wir haben vor, die Frage der Identität der auf verschiedenen Wegen gewonnenen Präparate noch weiter zu prüfen. Weiter unten schildern wir den Vergleich derartiger Präparate auf ihr Adsorptionsvermögen gegen Malachitgrün.

Nach demselben Verfahren lassen sich auch andere Dioxopiperazine strukturell abwandeln. Zum Beispiel haben wir das Alanyl-serin-anhydrid



mit wässeriger Argininlösung in ein ausgezeichnet kristallisiertes, auch in heißem Wasser sehr schwer lösliches Produkt verwandelt, das wir für Allo-methylen-methyl-dioxopiperazin oder ein nahes Verwandtes desselben halten.

Zur Analyse wurde bei 78° und 0,5 mm über P_2O_5 getrocknet.

2,705 mg Substanz: 0,475 ccm N (20°, 745 mm, 50 Proz. KOH)
$C_6H_8O_2N_2$ (140,08) Ber.: N 20,00 Proz., Gef.: 20,05 Proz.

Wir legen auf diesen Befund Wert, weil er zeigt, daß das Anhydrid zweier in den Proteinen weit verbreiteter Aminosäuren durch eine andere, ebenfalls weit verbreitete Aminosäure in wässeriger Lösung isomerisiert werden kann. Das natürliche Vorkommen unserer Allopiperazine gewinnt durch diese Feststellung an Wahrscheinlichkeit.

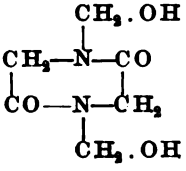
Wir haben uns ferner überzeugt, daß auch Ammoniak, Guanidinsalze und ähnliche Basen in wässeriger Lösung umlagernd auf Aminosäureanhydride wirken, und behalten uns vor, die Umlagerung von Peptiden und Peptidanhydriden in wässeriger Lösung eingehender zu untersuchen.

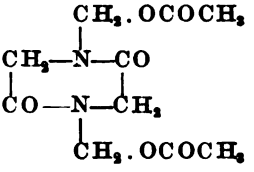
Kolloidale Formaldehydverbindung des Methylen-methyl-dioxopiperazins.

Die Einwirkung von Formaldehyd auf Aminosäuren und Dioxopiperazine ist im Hinblick auf die Chemie der Formaldehydgerbung und auf ähnliche Fragen wiederholt untersucht worden. Glycinanhydrid liefert mit dem Aldehyd nach den Feststellungen von *Cherbuliez* und *Feer*[1]) und von *Bergmann*, *Jacobsohn* und *Schotte*[2]) das sogenannte N, N'-Dimethylol-dioxopiperazin VII. Das Diacetat VIII dieses Stoffes haben *Bergmann*, *Miekeley* und *Kann*[3]) bei gleichzeitiger Einwirkung von Trioxymethylen, Essigsäureanhydrid und Natriumacetat auf Glycinanhydrid gewonnen. Alle diese Stoffe sind, genau wie die ver-

[1]) Helv. chim. acta 5, 678, 1922.
[2]) H. 131, 18, 1923.
[3]) H. 146, 247, 1925.

schiedenen bisher besprochenen isomeren Dioxopiperazine, gut kristallisiert.

VII. 

VIII. 

Stoffe von viel geringerem Kristallisationsvermögen entstehen, wenn man Aldehyde auf Methylen-methyl-dioxopiperazine IV einwirken läßt. Z. B. hat die Verbindung aus äquivalenten Teilen des Piperazins mit Formaldehyd eine ausgesprochene Neigung, mit Wasser kolloide Lösungen zu bilden.

1 g Methylen-methyl-dioxopiperazin wurden mit 10 ccm einer 3proz. Formaldehydlösung (6 Mol.) im geschlossenen Rohr 2 Stunden auf 75° erwärmt. Dabei erfolgte bald völlige Lösung. Sie wurde unter geringem Druck verdampft und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, um eine kleine Menge unverändertes Ausgangsmaterial abzuscheiden (0,2 g. Ber.: N 20,0 Proz., gef.: N 19,71 Proz.). Das Filtrat davon hinterließ bei erneutem Verdampfen einen schwach gelb gefärbten Sirup, der zur vollständigen Entfernung des nicht verbrauchten Formaldehyds noch stundenlang im Hochvakuum gehalten wurde. Schließlich wurde in wenig heißem Wasser aufgenommen und durch Zusatz von absolutem Alkohol wieder abgeschieden. Wir erhielten dabei einen flockigen Niederschlag, der abgesaugt, mit Alkohol ausgekocht und im Vakuumexsikkator getrocknet wurde. 0,7 g. Weitere Mengen ließen sich durch Verarbeitung der wässerig-alkoholischen Mutterlauge gewinnen, so daß schließlich 1,0 g erhalten wurden.

Zur Analyse wurde bei 56° und 0,5 mm über Phosphorpentoxyd auf konstantes Gewicht gebracht.

0,1001 g Substanz: 0,1825 g CO_2 und 0,0535 g H_2O,
0,1254 g „ 0,2268 g CO_2 „ 0,0696 g H_2O,
0,1322 g „ 19,95 ccm N (19°, 735 mm, 33 Proz. KOH),
2,780 mg „ 0,403 „ N (19°, 748 „ 50 „ KOH).

$C_7H_{10}O_3N_2$ (170,10) Ber.: C 49,41 Proz., H 5,93 Proz., N 16,47 Proz.
Gef.: C 49,72 „ H 5,98 „ N 16,78 „
C 49,32 „ H 6,21 „ N 16,68 „

Das Monoformal-methylen-methyl-dioxopiperazin, wie die Verbindung vorerst genannt werden mag, bis die Struktur geklärt ist, läßt unter dem Mikroskop keinerlei kristallinische Teile erkennen. Es löst sich äußerst wenig oder gar nicht in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln. Mit kaltem Wasser quillt es erst zu einer klebrigen Masse, die langsam mehr oder weniger in Lösung geht. Heißes Wasser

löst unter ähnlichen Erscheinungen ziemlich schnell, und beim Erkalten scheidet sich nichts mehr ab. Aber bei längerem Aufbewahren in Glasgefäßen oder, wenn eine geringe Menge von Elektrolyten zugefügt wird, tritt Gallertbildung ein, ähnlich wie bei Leim. Nur ist in unserem Falle zur Gelatinierung eine etwas größere Konzentration erforderlich als bei natürlichem Leim.

Die 1proz. wässerige Lösung zeigt kurz nach dem Auflösen keine sichtbare Gefrierpunktserniedrigung. Nach drei- bis vierstündigem Stehen treten aber deutliche, wenn auch geringe Depressionen ein, die jedoch auch mit der Zersetzlichkeit der Formalverbindung zusammenhängen könnten, von der weiter unten noch die Rede sein wird. Die Molekulargewichtswerte von 3000 bis 1000, die sich aus den gefundenen Depressionen errechnen, haben darum eine recht zweifelhafte Bedeutung für die Teilchengröße unserer Formalverbindung.

Läßt man die wässerigen Lösungen unseres Formaldioxopiperazins in dünner Schicht auftrocknen, so entstehen glasklare Filme, die etwas spröder sind als natürliche Gelatine. Behandelt man derartige Filme mit Chromat, so werden sie lichtempfindlich und nach Belichtung sind sie schwer löslich in warmem Wasser. Man kann daher mit Hilfe unserer Monoformalverbindung Lichtdrucke herstellen, wie mit Gelatine.

Wässerige Lösungen der Formalverbindung geben keine Biuretreaktion. Dagegen geben sie auch in sehr großer Verdünnung mit Gerbstoffen schwer lösliche Niederschläge.

Beim Erhitzen mit Säuren oder beim längeren Kochen mit Wasser verliert die Formalverbindung einen großen Teil ihres Formaldehyds, aber niemals den ganzen, ursprünglich aufgenommenen Betrag, sondern nur etwas mehr als die Hälfte. So wurden

bei vierstündigem Kochen mit Wasser abgespalten	10,9	Proz.	Formaldehyd
bei vierstündigem Kochen mit starker Phosphorsäure abgespalten	10,4	„	„
bei elfstündigem Kochen mit starker Phosphorsäure abgespalten	11,8	„	„
berechnet für 1 CH_2O	17,6	„	„

Bei allen derartigen Zersetzungen fallen nach einiger Zeit farblose, amorphe, ganz unlösliche Niederschläge aus, die in der Zusammensetzung zwischen der Monoformalverbindung und dem Methylen-methyldioxopiperazin stehen. Es handelt sich also nicht um einen bloßen Koagulationsvorgang, wenn auch die äußeren Erscheinungen stark daran erinnern.

Die Schwerlöslichkeit der Monoformalverbindung in den meisten organischen Lösungsmitteln und ihre Zersetzlichkeit in der Hitze haben

uns vorerst gehindert, Bestimmungen der Teilchengröße in Phenol- oder Eisessiglösung auszuführen.

Katalytisch mit Palladiumschwarz erregter Wasserstoff wird von der Formalverbindung nicht aufgenommen, während das Ausgangsmaterial, das Methylen-methyl-dioxopiperazin, unter diesen Umständen leicht zu Alaninanhydrid hydriert wird[1]).

Wir glauben aus dem Verhalten des Monoformal-methylen-methyl-dioxopiperazin den Schluß ziehen zu dürfen, daß für das kolloidchemische Verhalten der Eiweißkörper und insbesondere der Gelatine der Aufbau aus einer größeren Anzahl verschiedenartiger Aminosäuren keineswegs unerläßliche Vorbedingung ist.

Verhalten verschiedenartiger Dioxopiperazine gegen Gerbstoffe und Farbstoffe.

Wir hatten schon wiederholt darauf hingewiesen, daß unsere Iso- und Allo-dioxopiperazine ein viel größeres Verbindungs- und Adsorptionsvermögen für Gerbstoffe und Farbstoffe aufweisen, als die bisher bekannten Dioxopiperazine. Wir haben in dieser Richtung einige Vergleichsversuche mit verschiedenen Strukturtypen von Dioxopiperazinen angestellt, die im folgenden mitgeteilt werden mögen. Die Versuche zeigen nur halbquantitativen Charakter, reichen aber zur Gewinnung eines übersichtlichen Bildes vollkommen aus.

Die erste Versuchsreihe wurde mit Tannin ausgeführt. Es handelte sich um ein Präparat aus chinesischen Zackengallen, das sorgfältig nach dem sogenannten Essigätherverfahren gereinigt war.

Eine 1proz. wässerige Tanninlösung, welche polarisiertes Licht im 1-dm-Rohr um $+ 0{,}60^0$ ablenkte, wurde mit 5 Proz. ihres Gewichts an dem zu untersuchenden Dioxopiperazin ¼ bis 2 Stunden geschüttelt, dann unter Schutz vor Verdunstung durch ein kleines, immer gleich gewähltes Filter (7 cm, Nr. 595, von Schleicher und Schüll) filtriert und dann wieder optisch untersucht. Die Abnahme des Drehungsvermögens gab ein ungefähres Bild von der aus der Lösung durch Adsorption am Ungelösten verschwundenen Tanninmenge. Wir haben uns dabei überzeugt, daß die Filtration auf den Drehungswert der Tanninlösung keinen größeren Einfluß als $0{,}01^0$ ergab.

Man erkennt, daß gewöhnliche Dioxopiperazine und auch solche, die wie die Dibenzalverbindung von *Sasaki* Doppelbindungen an den Piperazinkern angeschlossen enthalten, ein recht geringes Adsorptionsvermögen für Tannin aufweisen, daß dieses aber sofort sehr stark ansteigt

[1]) H. 146, 247, 1925.

Stoff	Angewandte Menge Proz.	Zeit Min.	Abgelenkte Drehung Grad	Abnahme in Proz.
Glycinanhydrid	5	15	+ 0,54	10
Glycyl-serinanhydrid	5	15	+ 0,53	11
Methylen-dioxo-piperazin I	5	15	+ 0,49	18
Methylen-m.-dioxopiperazin IV . . .	5	15	+ 0,49	18
Dibenzal-dioxo-piperazin[1])	5	15	+ 0,48	20
Iso-methylen-dioxopiperazin	5	15	+ 0,30	50
Iso-methylen-m.-dioxopiperazin V . .	5	15	+ 0,25	58
Dasselbe	5	120	+ 0,20	66
„	10	120	+ 0,05	91
Allo-methylen-dioxopiperazin III . .	5	15	+ 0,28	53
Allo-methylen-m.-dioxopiperazin VI .	5	15	+ 0,28	53

mit dem Übergang zu Iso- und Allopiperazinen, die sich in der Festigkeit ihres übermolekularen Gefüges mehr den Eiweißstoffen nähern.

Die Eindeutigkeit dieser Adsorptionsversuche leidet aber darunter, daß Glycinanhydrid und Methylen-methyl-dioxopiperazin erheblich löslich in Wasser sind. Dadurch wird naturgemäß die Einheitlichkeit des Adsorptionsvorganges getrübt. Die gelösten Anteile könnten ferner den Drehwert der wässerigen Tanninlösung beeinflussen. Wir haben darum in einer zweiten Versuchsreihe die Menge des Gesamtgelösten bestimmt und festgestellt, wieviel davon aus Gerbstoff besteht. Wir verfuhren dabei ähnlich, wie es bei der bekannten Hautpulvermethode (Schüttelverfahren) zur Untersuchung von Gerbstofflösungen üblich ist. Die Arbeitsweise war folgende:

Die verwendete Gerbstofflösung wurde zunächst auf ihren Gehalt an gelösten, nicht flüchtigen Stoffen durch Eindampfen und Wägen einer Probe untersucht und das Gesamtgelöste dann durch Schütteln einer Probe mit schwach chromiertem Hautpulver in Gerbstoffe und Nichtgerbstoffe unterschieden. Dann wurden 60 ccm der ursprünglichen Gerbstofflösung mit dem als Adsorptionsmittel dienenden Aminosäureanhydrid 2 Stunden geschüttelt, die Lösung filtriert, 20 ccm zur Bestimmung des Gesamtlöslichen eingedampft und gewogen und aus einer zweiten, etwas größeren Probe der Gerbstoff durch Schütteln mit schwach chromiertem Hautpulver heraus adsorbiert und 20 ccm entgerbte Flüssigkeit zur Bestimmung der Nichtgerbstoffe eingedampft und gewogen. Wir führen einige Ergebnisse kurz an:

Glycinanhydrid und Tannin. 2,854 g Glycinanhydrid wurden geschüttelt mit 100 ccm Tanninlösung, die ursprünglich 0,2144 g Gerbstoff enthielt. Nach 2 Stunden betrug der Gerbstoffgehalt wiederum 0,2176 g, es war also gar kein Gerbstoff vom ungelösten Glycinanhy-

[1]) *Sasaki*, Chem. Ber. 54, 163, 1921.

drid aufgenommen. Dagegen war der Gehalt der Lösung an Nichtgerbstoffen gestiegen um 1,02 g. Man erkennt daraus, wie große Mengen Glycinanhydrid in Lösung gegangen sind.

Iso-methylen-methyl-dioxopiperazin und Tannin. 1,029 g Piperazin, 60 ccm einer Tanninlösung von 0,231 Proz., 2 Stunden geschüttelt. Die Tanninlösung enthielt dann noch 0,0855 Proz. Gerbstoff. Der Gehalt der Lösung an Nichtgerbstoffen hatte nicht zugenommen. Das Piperazin hatte 8,5 Proz. seines Gewichts an Gerbstoff absorbiert.

Iso-methylen-methyl-dioxopiperazin und Eichenrindengerbstoff. 0,91 g Piperazin, 100 ccm einer Gerbstofflösung von 0,311 Proz. Gehalt, 3 Stunden. Das Isopiperazin hatte 5,7 Proz. seines Gewichts an Gerbstoff aufgenommen.

Bei einem analogen, mit Glycinanhydrid angestellten Versuch wurde keine Abnahme des Gerbstoffgehalts der wässerigen Lösung festgestellt.

Iso-methylen-methyl-dioxopiperazin und Quebrachogerbstoff. Das Isopiperazin nahm 5,8 Proz. seines Gewichts an Gerbstoff auf.

Verhalten verschiedener Dioxopiperazine gegen Malachitgrün. Eine Malachitgrünlösung von 0,2 Proz. Gehalt wurde mit 2,5 Proz. der einzelnen Dioxopiperazine in neutraler Flotte 1 Stunde geschüttelt, dann zentrifugiert und der Gehalt der Lösungen kolorimetrisch im *Pulfrich*schen Stufenphotometer verglichen. In einzelnen Fällen wurde auch mehr Dioxopiperazin angewandt oder längere Zeit geschüttelt.

				Adsorption:
Glycinanhydrid	2,5 Proz.,	1 Stunde,		0,9 Proz.
Glycinanhydrid	5 „	1 „		3 „
Methylendioxopiperazin	2,5 „	1 „		2,2 „
Iso-methylen-dioxopiperazin	2,5 „	1 „		35,6 „
Allomethylen-dioxopiperazin	2,5 „	1 „		16,7 „
Methylen-methyl-dioxopiperazin	2,5 „	1 „		6,3 „
Iso-methylen-methyl-dioxopiperazin	2,5 „	1 „		70 „
Iso-methylen-methyl-dioxopiperazin	2,5 „	2 „		76 „
Allo-methylen-methyl-dioxopiperazin	2,5 „	1 „		60,3 „
Seidenfibroin	2,5 „	1 „		100,0 „
Zephirwolle	2,5 „	1 „		97,6 „
Benzaldehydverbindung[1]) des Methylen-dioxopiperazins	2,5 „	1 „		98,3 „

Ganz ähnlich war das allgemeine Verhalten bei Verwendung von Säurefuchsin als Farbstoffe.

[1]) Diese Verbindung wird bei anderer Gelegenheit genauer beschrieben werden.

Untersuchungen zur Frage der „Neoglucose".

Von

Ken Iwasaki.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 29. Juni 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Im folgenden seien einige Versuche mitgeteilt, die zur Prüfung der Angabe von *Lundsgaard* und *Holbøll* angestellt worden sind, nach der unter Wirkung des Insulins bei gleichzeitiger Anwesenheit von frischer Muskelsubstanz eine im Vergleich zur gewöhnlichen Gleichgewichtsglucose gleich reduzierende, aber niedriger drehende „Neoglucose" entstehen sollte.

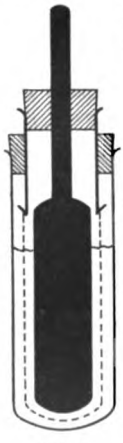


Abb. 1.

Angewandt wurde stets holländisches Insulin-Neu (*Tetewop*). Dialysiert wurde durch Kollodiumhülsen. Sehr gut bewährt hat sich die aus Abb. 1 ersichtliche Anordnung bei der Dialyse.

Die Muskulatur von weißen Mäusen und von Meerschweinchen wurde steril aus dem Tiere entnommen, sofort steril zerkleinert und in möglichst frischem Zustand zum Versuch verwandt.

Versuch 1 zeigt, daß das angewandte Insulin unter den angegebenen Versuchsbedingungen weder den Reduktions- noch den Drehungswert einer Traubenzuckerlösung ändert.

Versuch I.

	Traubenzuckerlösung ccm	Insulinlösung ccm	Dest. Wasser ccm	Temperatur 18°	Temperatur 37°	Zuckergehalt der Lösung in Proz. polarimetrisch	nach *Kumagawa-Suto*	nach *Hagedorn-Jensen*
I	48,0	—	2,0	—	—	1,830	1,835	1,850
II	48,0	2,0 (25 E.)	—			1,790	1,818	1,830
III	48,0	ebenso	—		—	1,792 *)	1,831 *)	1,854 *)
IV	48,0	„	—	—	3 Stdn. erwärmt	1,823	1,835	1,844
V	48,0	„	—	—		1,843 *)	1,854 *)	1,840 *)

*) Nach Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure.

Versuch II.

		Bei 37° Stdn.	Dauer der Dialyse Stdn.	Zuckergehalt d. Außenlös., Proz. polarimetrisch	nach *Hagedorn-Jensen*	nach *Kumagawa-Suto*	Bemerkungen
100 ccm Traubenzuckerlösung (in phys. NaCl) + Insulin (30 E.) + 3 g Muskel (von w. Mäusen)	I	1	2	1,390	1,42	1,400	Außenlösung ganz klar
	II	2	2	1,050	1,06	1,070	

Fügt man zu der Traubenzuckerlösung gleichzeitig Insulin und Muskelgewebe (Versuch 2), so findet man nach ein- bzw. zweistündiger Einwirkung und nachheriger Dialyse durch Kollodiumhülsen in der Außenflüssigkeit eine Zuckerlösung, deren Zuckergehalt, gemessen durch Drehung und Reduktion [nach *Kumagawa-Suto*[1]) und nach *Hagedorn-Jensen*], identischen Wert ergibt. Dasselbe Resultat ergab auch Versuch 3.

Versuch III.

		Bei 37° Stdn.	Dauer der Dialyse Stdn.	Zuckergehalt d. Außenlös., Proz. polarimetrisch	nach *Kumagawa-Suto*	nach *Hagedorn-Jensen*	Bemerkungen
150 ccm Traubenzuckerlösung (in phys. NaCl) + Insulin (50 E.) + 2 g Muskel (von w. Mäusen)	I	1	$1^1/_2$	1,332	1,365	1,358	Außenlösg. frei von Eiweiß und Kreatinin; ganz klar
	II	2	$1^1/_2$	1,197	1,188	1,206	
	III	3	$1^1/_2$	1,110	1,121	1,130	
	IV	4	$1^1/_2$	1,403	1,400	1,400	

In dem folgenden Versuch 4 wurde die Menge des zugefügten Muskelgewebes erhöht (7,5 g auf 100 ccm Traubenzuckerlösung),

Versuch IV.

		Bei 37° Stdn.	Dauer der Dialyse Stdn.	Zuckergehalt d. Außenlös., Proz. polarimetrisch	nach *Kumagawa-Suto*	nach *Hagedorn-Jensen*
200 ccm Traubenzuckerlösg. (in phys. NaCl), Insulin (100 E.), 15,0 g Muskelgewebe (vom Meerschweinchen)	I	1	$1^1/_2$	1,040	1,059	1,055
	II	2	$1^1/_2$	1,025	1,032	1,039
	III	3	$1^1/_2$	0,983	0,990	0,980
	IV	4	$1^1/_2$	0,912	0,923	—

[1]) Es ist stets umkristallisiertes (fein kristallisiertes) Kupfersulfat zu gebrauchen.

Versuch V.

	Bei 38°	Dialyse					Zuckergehalt nach der Dialyse, Proz.						Gesamtzucker, Proz.		
		Dauer	Außenlösung ccm		Innenlösung ccm		Außenflüssigkeit			Innenflüssigkeit *)					
	Stdn.	Stdn.	vor	nach	vor	nach	polar.	*K.-S.*	*H.-J.*	polar.	*K.-S.*	*H.-J.*	polar.	*K.-S.*	*H.-J.*
100 g Traubenzuckerlösung (in phys. ClNa), Insulin (50 E.), 10 g Muskel (vom Meerschweinchen)	2	1½	20	19	35	36	0,980	0,994	1,019	1,103	1,156	1,164	1,664	1,729	1,750
100 g Traubenzuckerlösung (in phys. ClNa), 10 g Muskel (vom Meerschweinchen)	2	1½	20	20	35	35	0,980	0,999	1,019	1,104	1,162	1,186	1,664	1,733	1,768
Traubenzuckerlösung (in phys. ClNa)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,840	1,869	1,850

Versuch VI.

100 g Traubenzuckerlösung (in phys. ClNa), Insulin (100 E.), 10 g Muskel (vom Meerschweinchen)	2	1½	20	20	35	35	0,725	0,762	0,759	0,842	0,946	0,927	1,259	1,381	1,361
100 g Traubenzuckerlösung (in phys. ClNa), 10 g Muskel (vom Meerschweinchen)	2	1½	20	20	35	35	0,725	0,748	0,746	0,849	0,943	0,906	1,263	1,370	1,332
Traubenzuckerlösung (in phys. ClNa)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,440	1,464	1,434

*) Nach dem Enteiweißen mit Phosphorwolframsäure.

die Insulinwirkung in vier Portionen auf 1, 2, 3 und 4 Stunden ausgedehnt; dann wurde 1½ Stunden dialysiert. Auch hier war der Drehungs- und Reduktionswert der Außenlösung vollkommen gleich.

In den Versuchen 5 bis 9 wurde die der Zucker-Insulinlösung zugefügte Muskelmenge noch weiter erhöht (10 g auf 100 ccm Lösung) und der Zuckergehalt nach der Dialyse sowohl in der Außen- wie in der Innenlösung bestimmt. Bei diesen Versuchen mit großen Zuckermengen ist (wenn auch oft nur andeutungsweise) eine Zunahme der Reduktion bei gleichbleibender Drehung zu beobachten. Doch kann dieser Befund in unseren Versuchen nicht im Sinne einer Entstehung von Neoglucose durch gleichzeitige Insulin- und Muskelwirkung verwertet werden, da dieselbe Differenz zwischen Drehung und Reduktion in dem Versuch mit Muskel allein auch ohne Insulinzugabe zu beobachten ist.

Von der Muskulatur wird eine reduzierende (nicht drehende) Substanz abgegeben. Diese diffundiert nur wenig. Deshalb ist der erwähnte Unterschied in der Außenflüssigkeit nur eben angedeutet. Daß neben dem Traubenzucker allem Anschein nach hier noch ein anderer reduzierender Körper vorhanden ist, dafür spricht auch, daß die Übereinstimmung zwischen der *Kumagawa-Suto*- und der *Hagedorn-Jensen*-Methode nicht mehr so absolut ist wie bei der reinen Zuckerlösung, die Substanz also das $Cu^{\cdot\cdot}$ und das Ferricyanidion verschieden stark reduziert. — Nimmt man die Summe der Zuckermenge der Außen- und der Innenflüssigkeit, und vergleicht man diese mit der beim Versuch ursprünglich verwendeten, so ist stets ein etwas niedrigerer Wert zu konstatieren. Dies ist zwanglos auf einen geringen Wassergehalt der Muskulatur, die dann verdünnend wirkt, zurückzuführen. Möglicherweise wirkt eine ganz schwache Glykolyse im Muskelgewebe mit: Das Gesamtresultat wird hierdurch nicht geändert.

Dieselben Verhältnisse wie im Versuch 5 findet man auch in den Versuchen 6, 8 und 9.

Versuch VII.

	Bei 37° Stdn.	Drehung	Reduktion (nach *Hagedorn-Jensen*) auf Glucose ber. Proz.	Bemerkungen
100 g physiol. Kochsalzlösung, 10 g Muskelgewebe (vom Meerschweinchen)	3	0	0,06	Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure, Sulfosalicylsäurereaktion negativ; *Jaffé*-Reaktion positiv. *Weyl*sche Reaktion schwach positiv

Versuch VIII.

		Bei 38°	Dialyse: Dauer	Außenlösung ccm		Innenlösung ccm		Zuckergehalt nach der Dialyse, Proz.: Außenflüssigkeit			Innenflüssigkeit			Gesamtzuckergehalt, Proz.		
		Stdn.	Stdn.	vor	nach	vor	nach	polar.	*K.-S.*	*H.-J.*	polar.	*K.-S.*	*H.-J.*	polar.	*K.-S.*	*H.-J.*
100 ccm Traubenzucker (in phys. ClNa), 8 g Muskelgewebe (Meerschweinch.), Insulin (100 E.)	dialysiert	2	1½	20	20	35	35	0,836	0,828	0,832	0,994	0,998	1,051	1,472	1,471	1,526
	nicht dialysiert	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,475	1,444	1,547
100 ccm Traubenzucker (in phys. ClNa), 8 g Muskelgewebe	dialysiert	2	1½	20	20	35	35	0,858	0,855	0,852	0,990	0,992	1,060	1,481	1,481	1,547
	nicht dialysiert	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,441	1,408	1,512
100 ccm phys. ClNa-Lösung, 8 g Muskelgewebe	dialysiert	2	1½	20	20	35	5	—	—	$0{,}008_5$ *)	—	—	0,016 *)	—	—	0,021
	nicht dialysiert	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,041
Traubenzuckerlösung (in phys. ClNa)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,570	1,581	1,576

*) Als Traubenzucker berechnet.

Versuch IX.

75 ccm Traubenzucker (in phys. ClNa), 10 g Muskelgewebe (Meerschweinch.), Insulin (100 E.)	dialysiert	3	1	20	20	30	30	1,090	1,091	1,115	1,080	1,101	1,138	1,801	1,828	1,880
	nicht dialysiert, sofort enteiweißt (Phosphorwolframsäure)													1,800	1,858	1,892
75 ccm Traubenzucker (in phys. ClNa), 10 g Muskelgewebe	dialysiert	3	1	20	20	30	30	1,070	1,070	1,088	1,080	1,110	1,141	1,801	1,858	1,935
	nicht dialysiert, sofort enteiweißt (Phosphorwolframsäure)													—	—	—
75 ccm phys. ClNa-Lösung, 10 g Muskelgewebe	dialysiert	3	1	20	20	30	30	—	—	$0{,}009_8$	—	—	$0{,}037_4$	—	—	0,044
	nicht dialysiert, sofort enteiweißt (Phosphorwolframsäure)													—	—	$0{,}058_2$
Traubenzucker (in phys. ClNa-Lösung)		—	- -	—	—	—	—	—	-	- -	—	- -	-	2,042	2,048	2,010

Daß das Muskelgewebe eine reduzierende, mit der *Hagedorn-Jensen*-Methode nachweisbare Substanz enthält, zeigen die Versuche 7, 8 und 9.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die vorliegenden Versuche keine Stütze für die Annahme einer „Neoglucose", die unter der kombinierten Wirkung von Insulin und Muskelgewebe auf Traubenzucker entstehen soll, geben.

Literatur.

Ch. Lundsgaard und *S. A. Holbell*, The Journ. of biol. Chem. **62**, 453, 1924; **65**, 305, 323, 343, 363, 1925. Vgl. auch *A. D. Barbour*, Journ. Biol. Chem. **67**, 53, 1926.

Zur Chemie und Physiologie der Pflanzenphosphatide.

IV. Mitteilung:

Über den Zusammenhang von Vitaminwirkung und Oberflächenaktivität der Phosphatide.

Von

V. Grafe und **H. Magistris.**

(Aus dem chemischen Laboratorium der Neuen Wiener Handelsakademie.)

(Eingegangen am 13. Juli 1926.)

Namentlich seit dem Aufblühen der Lehre von den Kolloiden hat man auf dem Gebiete der Immunitätslehre, beim Studium der Vergiftungserscheinungen und der Stoffwechsellehre überhaupt immer mehr dem Gedanken Raum gegeben, daß nicht allein und mitunter nicht einmal in erster Linie die chemische Zusammensetzung der untersuchten Stoffe für deren Wirkung im Organismus maßgebend sei, sondern daneben deren physikalische Eigenschaften, da zur Wirksamkeit im Plasma naturgemäß der Kontakt des betreffenden Stoffes mit dem Plasmakolloid maßgebend sein werde, also das Verhältnis der wirksamen Substanz zu den Grenzschichten. So entstanden einerseits eine Reihe von Hypothesen über die Permeabilitätserscheinungen, wie die Lipoidhypothese von *Meyer-Overton*, die *Ruhland*sche Ultrafiltertheorie, die *Traube*sche Haftdrucklehre, *Nathansohns* Mosaikhypothese, *Czapeks* Lehre der Äquikapillarität u. a., andererseits Studien über die chemische und physikalische Natur dieser Grenzschichten.

Traube wies als erster auf die Möglichkeit einer kapillaranalytischen Diagnose von Krankheiten hin und zeigte, daß bei manchen Erkrankungen des Magens, wie Carcinom, Pylorusstenose usw. und der Nieren, ferner Ovarialkrebs, Lebercirrhose, Carcinom der Gallenblase, schwerer Pneumonie, verschiedene Oberflächenspannungsdifferenzen der betreffenden Gewebesäfte zu beobachten sind, die durch einfache kapillaranalytische Methoden bestimmt werden können und die bei pathologischen Urinen aus gut arbeitenden Nieren nicht wahrgenommen werden. Durch seine stalagmometrische Untersuchung der Oberflächenspannung ließ sich auch die pharmako-dynamische und toxische Wirksamkeit von Arzneimitteln bzw.

von Giften bestimmen, sowie auch die anästhesierende Kraft verschiedener Anästhetica meist mit der Oberflächenspannung der wässerigen Lösungen parallel geht[1]).

Diese Erscheinungen werden durch den Umstand verständlich, daß die osmotischen Beziehungen gelöster Stoffe zum Plasmakolloid mit der Oberflächenspannung der wässerigen Lösungen dieser Stoffe in nahem Zusammenhang stehen. Da die Oberflächenspannung aber die Tropfengröße bestimmt, hat man in der durch verschiedene Instrumente bestimmbaren Tropfenzahl ein Maß für dieselbe; das einfachste derselben ist das *Traube*sche Tropfenstalagmometer[2]), mit dem die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt wurden, nachdem diese Methode befriedigende Übereinstimmung auch mit den anderen gebräuchlichen gegeben hatte. Es gibt bekanntlich *negativ oberflächenaktive* Stoffe, wie die Nichtleiter Glycerin und die Zuckerarten, welche also die Oberflächenspannung des Lösungs- oder Dispersionsmittels erhöhen, und *positiv oberflächenaktive*, d. h. die Oberflächenspannung des Lösungsmittels erniedrigende, welche die für unsere Fälle wichtigeren darstellen. Das rasche Passieren der Grenzschichten, welches zur Oberflächenaktivität jedenfalls in nahen Beziehungen steht, tritt um so schneller ein, je oberflächenaktiver der betreffende Stoff ist. Da hierdurch schnellere Wirkung erfolgt, kann man in der Kapillaraktivität auch ein Maß für die pharmakologische und toxische Wirksamkeit sehen.

Vor kurzem hat nun *v. Hahn*[3]) auf die Beziehungen hingewiesen, die zwischen Oberflächenaktivität und Vitaminwirkung einiger Nahrungsstoffe bestehen, indem er zeigte, daß sich die als vitaminreich bekannten Nahrungsmittel durch starke Oberflächenspannungserniedrigung auszeichnen. Damit wird der Versuch gemacht, die Vitaminwirkung weniger auf die chemische Spezifität eines bestimmten chemischen Komplexes oder bestimmter chemischer Gruppen zu beziehen als auf physikalische Momente, womit einerseits eine Handhabe gewonnen wäre, die „Denaturierungserscheinungen" bei der Reinigung von vitaminreichen Nahrungsmitteln zu verstehen, andererseits eine Erklärung für die auch von anderer Seite behauptete Unspezifität der Vitamine angebahnt würde.

---

[1]) *I. Traube*, Chem.-Ztg. **42**, 521, 1919; **43**, 129, 1920; Arch. f. Physiol. **158**, 276, 1916; **105**, 541, 1904; **128**, 419, 1908; **132**, 551, 1910; **140**, 109, 1911; **160**, 501, 1919; **161**, 530, 1920; diese Zeitschr. **54**, 316, 1913; Intern. Zeitschr. f. Biol. **1**, 275, 1914; *J. Traube* und *F. Köhler*, ebendaselbst **2**, 42, 1915; *Traube* und *Blumenthal*, Arch. f. exper. Pathol. u. Therap. **2**, 117, 1905; *Bickel*, Deutsch. med. Wochenschr. **28**, 1905.

[2]) Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. **5**, 1357, 1912.

[3]) *F. V. v. Hahn*, diese Zeitschr. **208**, 732, 745, 1925.

Zweifel an der von *C. Funk*[1]) getroffenen und in den meisten Lehrbüchern festgehaltenen Einteilung der Vitamine und deren Spezifität als A-, B- und C-Vitamin erregten vor allem neben Überlegungen rein theoretischer Art Beschreibungen von Beriberi- und Skorbutfällen, bei denen die betreffenden Symptome keineswegs für diese Erkrankung allein charakteristisch waren. So wurde des öfteren bei Skorbutfällen die als für Beriberi kennzeichnend beschriebene sogenannte atrophische Form (Muskelatrophie, Spitzfußstellung usw.) beobachtet. Auch bei experimentell hervorgerufenen Avitaminosen an Tieren sind mannigfaltige Übergänge von Beriberi zu Skorbut beschrieben worden. *Mc Collum* und *Pitz*[2]) haben ferner gezeigt, daß Laxantia wie Mineralöle und Phenolphthalein, ferner *J. Thaler*[3]), daß sein Silberkolloidpräparat Elektrargol auf Skorbut heilenden Einfluß ausüben könne. *Williams*[4]) berichtet über β-Oxypyridin, β-Methylpyridon und 4-Phenylisocytosin, *Funk*[5]) über einige Purin- und Pyrimidinderivate als Beriberiheilmittel, *Hahn*[6]) über eine solche bei Chinin [nachdem *Cooper*[7]) eine derartige Wirkung von Chinin und Strychnin bei experimenteller Beriberi schon früher behauptet, dann aber widerrufen hatte].

Nachdem ferner auch *W. Kopaczewski*[8]) für die Abhängigkeit der Vitaminwirkung von einem bestimmten physikalischen Zustand der Materie und nicht von ihren chemischen Konstanten eingetreten war, was mit unseren Erfahrungen über die Vitaminwirksamkeit der Phosphatide vollkommen übereinstimmt, erscheint uns der Ausdruck *v. Hahns* „vitaminoider Charakter" für Stoffe mit Vitaminwirksamkeit berechtigt, wenn wir auch vorläufig noch nicht wie der genannte Forscher die Oberflächenaktivität allein als für diesen Zustand verbindlich ansehen möchten, sondern mehr noch die Fähigkeit dieser Stoffe, andere Komplexe und Gruppen in adsorptiver oder stöchiometrisch-chemischer Bindung zu erhalten und dadurch jenen physikalischen Zustand zu erreichen, der sich als vitaminoid ausprägt.

Brinkman und *v. Szent-Györgyi*[9]) haben gezeigt, daß eine einmalige Behandlung mit oberflächenaktiven Substanzen eine Membran (Kollodiumfilter) auf unbegrenzte Zeit für den kolloiden Blutfarbstoff permeabel macht, eine Beobachtung, die von *v. Hahn* dahin ergänzt wurde, daß die Dauer der Permeabilität nur dann unbegrenzt sei, wenn der durchtretende Stoff selbst oberflächenaktiv ist. Bei der Deutung der biologischen Wirksamkeit oberflächenaktiver Substanzen im Organismus überträgt nun *v. Hahn*

---

[1]) *C. Funk*, Die Vitamine. München 1924.
[2]) *W. Pitz*, Journ. of biol. Chem. **38**, 471; **36**, 439, 1918.
[3]) *J. Thaler*, Münch. med. Wochenschr. **64**, 1125, 1919.
[4]) *R. Williams*, Journ. Ind. Eng. Chem. **18**, 1197, 1921.
[5]) *C. Funk*, Münch. med. Wochenschr. 1913.
[6]) *F. V. v. Hahn*, l. c.
[7]) *E. A. Cooper*, Biochem. Journ. **7**, 268, 1913; Journ. of Hyg. **12**, 436, 1913.
[8]) *W. Kopaczewski*, Théorie et pratique des Colloides en Biologie et en Médicine. Paris 1923.
[9]) *R. Brinkman* und *A. v. Szent-Györgyi*, diese Zeitschr. **139**, 261, 1923.

den genannten Membraneffekt auf die Verhältnisse im Verdauungstrakt und sagt: „Der Chymus passiert das Darmlumen, in ihm befinden sich die Nährstoffe als höhere Zucker, als Eiweißspaltprodukte, Aminosäuren oder als Dextrine usw., also in einem Verteilungszustand, der durch ein geringes Diffusionsvermögen ausgezeichnet ist; außerdem finden sich normalerweise oberflächenaktive Substanzen im Chymus. Unter dem Einfluß dieser treten die kolloiden oder diesem Verteilungszustand nahestehenden molekulardispersen Nahrungskörper durch die Membran der Darmwand hindurch in die Blutbahn. *Der avitaminotische Zustand charakterisiert sich nun durch eine Abnahme der Oberflächenaktivität des Chymus*[1]), so daß allmählich die zur Ernährung des Körpers notwendigen Stoffe nicht mehr in dem richtigen gegenseitigen Mengenverhältnis durchtreten können."

Die enorme Vitaminwirkung von Pflanzenphosphatiden hat *Hansteen Cranner*[2]) festgestellt, und unsere seit Jahren angestellten Studien zur chemischen und physikalischen Charakteristik dieser stark oberflächenaktiven Stoffe legten den Gedanken nahe, auch deren Oberflächenaktivität näher zu studieren, da es sich hier einerseits zum erstenmal um völlig native Phosphatide handelt[3]), während andere Forscher, die mit organischen Lösungsmitteln und höheren Temperaturen arbeiteten, nachweislich Spaltungsprodukte solcher in Händen gehabt hatten, andererseits die Möglichkeit gegeben war, auch die Spaltungsprodukte solcher nativer Phosphatide auf ihre Kapillaraktivität im Zusammenhang mit der Vitaminwirkung zu prüfen.

Das Dialysat gegen Wasser, das man bei Lebenstemperaturen aus den verschiedensten Pflanzen und Pflanzenorganen erhalten kann, erweist sich als stark oberflächenaktiv, enthält keine Spur von Eiweißstoffen und zeigt eine bemerkenswerte Tendenz zur Membran- und Hautbildung. Das tritt namentlich dann hervor, wenn man die Fällung mit Bleiacetat eintrocknen läßt. Aus unseren oben genannten Arbeiten geht hervor, daß man verschiedene, durch ihre differente Fällbarkeit unterschiedene Phosphatide aus ein und demselben Objekt isolieren kann, aber die starke Oberflächenaktivität, die es zur Membranbildung so hervorragend disponiert, ist vornehmlich nur dem ersten, durch Bleiacetat fällbaren eigen und wird durch hochmolekulare, an den eigentlichen Phosphatidkomplex gebundene Kohlehydratgruppen bedingt. Osmometrische Untersuchungen dieser Stoffe sind im Gange. Stets sind ferner an den Phosphatidkomplex in Form von Leucobasen zwei Farbstoffkomponenten gebunden, eine gelbe, carotinoide und eine mit

---

[1]) Von uns hervorgehoben.

[2]) *Hansteen Cranner*, Weitere Beiträge zur Biochemie und Physiologie der pflanzlichen Zellphosphatide, herausgegeben von V. Grafe (Wien), Meldinger fra Norges Landbrukshoiskole 1925.

[3]) *V. Grafe*, diese Zeitschr. **159**, 447, 1925; *V. Grafe* und *V. Horvat*, ebendaselbst **159**, 449, 1925; *V. Grafe* und *H. Magistris*, ebendaselbst **162**, 366, 1925; ferner **176**, 266, 1926.

Mineralsäuren tiefrot werdende von Anthocyanincharakter. Die eine von ihnen fehlt nur in geschliffenem Reis und in Mais, und es beruht kaum auf einem zufälligen Zusammentreffen, daß die bekannten Avitaminosen mit diesen beiden Getreidearten verbunden sind. Bei der Trennung der in den Dialysaten vorhandenen verschiedenen Phosphatide ändert sich auch die Stärke der Oberflächenaktivität in charakteristischer Weise, es scheint die starke Oberflächenspannungsaktivität des ursprünglichen Dialysats sich gewissermaßen als Summe darzustellen, die durch gegenseitige Bindung der einzelnen Phosphatide zum größeren Molekularkomplex entsteht. Dieser Komplex leidet schon unter dem Einfluß von Temperaturen über 30°, durch Einwirkung von CO_2, auch schwachen Säuren, Licht usw., besonders aber von organischen Solvenzien schon bei niedrigen Temperaturen. Ferner geht dadurch die Fähigkeit verloren oder wird verändert, Elektrolyten und Nichtelektrolyten in Bindung zu erhalten. Vor allem trübt sich das Dialysat schon bei länger dauernder Dialyse unter normalen, besonders aber unter leicht veränderten äußeren Umständen unter Ausbildung einer unlöslichen Phosphatidform, deren Filtrat, die löslich gebliebene Phosphatidform enthaltend, bedeutend geringere Oberflächenaktivität zeigt. Löst man aber die trübende Substanz eben in NaOH auf und fügt die Auflösung zu dem Filtrat, ergibt sich wieder die frühere Größe der Oberflächenspannung. Die wasserunlöslichen, aber stark hydrophilen Phosphatide sind durch ihre hohe Oberflächenaktivität besonders geeignet, die Grenzschichten der plasmatischen Substanz zu bilden und von hier aus auch die Zellwände zu durchdringen. Durch diese Barriere vermögen nur wasserlösliche Phosphatide und diejenigen Stoffe zu dringen, die mit diesen wie erwähnt in Bindung stehen, wozu Elektrolyten wie Nichtelektrolyten gehören. Aber aus den verschiedensten Ursachen ist die Möglichkeit der Umwandlung der einen in die andere Phosphatidform und damit die Möglichkeit zu Speicherungsvorgängen und zu Veränderungen der Zellpermeabilität gegeben. Nach Behandlung mit organischen Solvenzien gehen diese und die Eigenschaften der Oberflächenaktivität vollkommen verloren. Es gelingt ferner, durch fraktionierte Fällung mit $AlCl_3$ verschiedene Phosphatide zu erhalten, die aber Tauben und Meerschweinchen gegenüber auch verschiedene Vitaminwirksamkeit entfalten, indem die eine der Fällungen sich als Antiberivitamin, die andere als Antiskorbuticum charakterisierte. Solche, von *Hansteen Cranner* angestellte Versuche zeigen, daß die einzelnen „Vitamine" ineinander übergehen können, oder vielmehr, daß der vitaminoide Zustand nach Richtung der spezifischen Wirksamkeit sich ändert. Denn bei unseren Untersuchungen dieser fraktioniert gewonnenen Phosphatide aus Erbsen konnten wir kaum chemische Verschiedenheiten der einzelnen Fraktionen aufzeigen; was gestört

erschien, war lediglich der Zusammenhang des Komplexes und damit die Oberflächenaktivität. Daß die hypothetischen Vitamine B und C nahe verwandt sein dürften, haben auch *Harrow* und *Krasnow*[1]) angenommen. Überhaupt finden wir ja Vitamine namentlich in solchen Organteilen, die für die Keimentwicklung wichtig sind, wie im Samen, wo ebenso wie die eigentlichen Nahrungsreserven auch der vitaminoide Zustand der gespeicherten Stoffe in höchst kompendiöser Form vorhanden sein muß. Daß grüne Pflanzenteile, wie die Blätter von Spinat, bei beträchtlicher Vitaminwirkung große Oberflächenaktivität vermissen lassen, ist dem Umstand zuzuschreiben, daß bei der Dialyse oder im filtrierten Preßsaft das Chlorophyll fehlt und dieses als Phosphatid der Hauptträger der genannten Wirkungen ist. Deswegen möchten wir im Gegensatz zu *Willstätter* und in voller Übereinstimmung mit *Stoklasa* an der Lecithinnatur des nativen Farbstoffs festhalten.

Um die Phosphatide als die vitaminöse Komponente von Pflanzenstoffen und als Hauptmoment derselben ihre Oberflächenaktivität zu charakterisieren, machte es sich der eine von uns (*H. Magistris*) zur Aufgabe, zunächst die Angaben *v. Hahns* nachzuprüfen und mit der Oberflächenwirksamkeit der nach unserer Methode gewonnenen Phosphatiddialysate zu vergleichen. Diese nativen Phosphatide, die in ihrem Molekularkomplex außer dem Lecithinkern, der als die bekannten Spaltungsprodukte Fettsäuren, Cholin und Glycerinphosphorsäure ergibt, noch Kohlehydrate, Purinkörper und Farbbasen enthalten, verhalten sich äußeren Einwirkungen gegenüber ebenso, wie es *Funk* von den Vitaminen beschreibt, während die von früheren Forschern, wie *Schulze*, *Winterstein*, *Trier* u. a., auf chemischem Wege dargestellten Körper dieser Art denaturierte, gespaltene und daher unwirksame Phosphatide, gewissermaßen nur den Lecithinkern derselben darstellten, aber wohl auch je nach der mehr oder weniger schonenden Gewinnung die einen oder anderen akzessorischen Gruppen führten, die wir bei unseren Phosphatiden immer zusammen mit ihrer kapillaren und Vitaminwirksamkeit finden.

Es zeigte sich bei den im nachfolgenden beschriebenen Untersuchungen, in welchen einerseits die Arbeitsweise *v. Hahns* genau eingehalten, andererseits Dialysate nach unserer Methode damit verglichen wurden, daß man bei den Preßsäften zum Teil zu anderen Resultaten kommt als bei Dialysaten, weil schon durch die mechanische Manipulation des Auspressens chemische und physikalische Veränderungen von Zellstoffen gesetzt werden, die einerseits die physikalische Konstitution, andererseits bekanntermaßen die vitaminöse Wirksamkeit

[1]) *B. B. Harrow* und *F. Krasnow*, Journ. of metabolic Research **2**, 401, 1922.

bedeutend in Mitleidenschaft ziehen[1]). Die in den Preßsäften enthaltenen Salze sind allerdings inaktiv, indessen treten einerseits aus den Zellen auch andere kapillaraktive Stoffe aus als Phosphatide, andererseits werden native Stoffe durch den Preßvorgang verändert. Solche Stoffe entfalten dann weder für sich noch im Zusammenhang mit den eigentlich vitaminösen eine Vitaminwirkung, beeinflussen aber in undurchsichtiger Weise die Kapillaraktivität. Die Oberflächenaktivität wurde nach einem Vorschlage von *v. Hahn* in „Graham" (Gh) ausgedrückt, wobei 1 Gh die Kraft ist, welche die Oberflächenspannung des Lösungsmittels um 1 Proz. herabsetzt. Die Zahlenwerte der Oberflächenaktivität errechnen sich nach der Formel: $\mathrm{Gh} = \left(1 - \frac{Iw}{Ix}\right) . 100$, worin Iw die Oberflächenspannung des Wassers und Ix die Oberflächenspannung des in Wasser gelösten zu untersuchenden Stoffes, beide gemessen nach der gleichen Methode und ausgedrückt im selben Maßsystem (in unserem Falle durch die Tropfenzahl) darstellt. Die Gewinnung der Preßsäfte geschah genau in der von *v. Hahn* beschriebenen Weise, jene der Dialysate in der von uns (beide Abhandlungen, l. c.) dargestellten Arbeitsmethodik.

Tabelle I.

Nr.	1 Substanz	2 Behandlung	3 Δ Oberflächenaktivität nach *v. Hahn*	4 Δ Oberflächenaktivität gefunden	5 Anzahl der Proben
1	Hafer	Ganzes Korn	17,2	13,7	2
2	„	Mehl	—	8,8	3
3	Gerste	Ganzes Korn	12,2	13,3	2
4	Weizen	Mehl	5,5	6,9	4
5	Reis	poliert	0,0	3,7	3*)
6	Mais	Ganzes Korn	14,3	15,1	3
7	„	Mehl	0,0	2,6	2
8	Erbsen	Ganzes Korn	18,1	21,0	3
9	„	Keime	11,1	11,5	2
10	„	Mehl	—	9,1	1
11	Bohnen	Ganzes Korn	—	18,4	3
12	„	Keime	11,8	8,7	1
13	Linsen	Ganzes Korn	—	14,6	2
14	Weißkohl	roh	17,6	18,2	3
15	„	gekocht	17,5	15,0	2

*) Auch der polierte Reis enthält Phosphatide, demnach also (im Gegensatz zu den Befunden *v. Hahns*) oberflächenaktive Stoffe, wenn auch in sehr verminderter (denaturierter) Form.

[1]) S. die Patentschriften: Ö. P. 70565 bis 70567, D. R.-P. 42105, Ung. P. 70194, Amer. P. 1169634 von *V. Grafe* und *K. Peche*.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	1 Substanz	2 Behandlung	3 Δ Oberflächenaktivität nach *v. Hahn*	4 Δ Oberflächenaktivität gefunden	5 Anzahl der Proben
16	Kartoffel	roh	24,3	19,9	4
17	„	gekocht	22,8	16,1	2
18	„	gedämpft	9,2	10,4	1
19	Kohlrübe	roher Saft	12,9	13,5	2
20	Tomate	roh	13,9	18,2	3
21	„	gekocht	10,7	12,6	1
22	Zwiebel	roh	26,5	23,2	2
23	Spinat	„	26,5	22,6	3
24	„	gekocht	—	16,1	2
25	„	getrocknet	—	5,5	4
26	Salat	roh	—	8,8	2
27	Zitrone	Saft, roh	22,6	22,8	3
28	„	Saft, gekocht	—	21,4	2
29	Banane	roh	25,8	19,9	3
30	Milch	„	32,3	32,9	2
31	„	pasteurisiert	—	31,0	3
32	„	gekocht	—	26,8	4
33	Butter	roh	1,4	0,9	3
34	Karotten	„	—	16,8	2

Im allgemeinen zeigt sich eine große Übereinstimmung mit den Befunden *v. Hahns*. Stark abweichend sind nur die Zahlen von 3,7 Gh bei Reis und von 2,6 Gh bei Maismehl.

Aus einer Reihe der oben untersuchten Nahrungsmittel wurden nun die nativen Phosphatide dargestellt und diese kapillaranalytisch untersucht.

Die Dialysate wurden nach gründlichem Auswaschen der geschnittenen Objekte mit destilliertem Wasser bei einer Temperatur von 17 bis 35° im Dunkelraum gewonnen, die sich immer bildende unlösliche Phosphatidfraktion, die sich als weißwolkige Trübung des Dialysewassers zu erkennen gab, durch ein Berkefeldfilter entfernt, das vollkommen klare, leicht gelblich gefärbte Filtrat im Vakuum konzentriert und die in gleicher Weise bei allen Objekten gewonnenen Flüssigkeiten gleicher Konzentration, welche nun ausschließlich die wasserlöslichen Phosphatide enthielten, zur Bestimmung der Oberflächenaktivität verwendet. Die Tabelle II gibt die Versuchswerte.

Die Übereinstimmung zwischen den Gh-Zahlen der Preßsäfte und der Dialysate ist eine recht gute, wenn man die oben gemachte Anmerkung berücksichtigt. Bei den scheinbaren Ausnahmen Zwiebel und Banane stimmen die Werte so ziemlich mit den von *v. Hahn* angegebenen der ultrafiltrierten Säfte, nämlich 10,3 Gh (9,4 Gh) bei Zwiebel und 8,8 Gh

Tabelle II.

Nr.	1 Produkt	2 Dialysiert durch Stunden	2 Dialysiert bei °C	3 Δ Oberflächenaktivität des Dialysats	4 Δ Oberflächenaktivität desselben Produkts bei der früheren Behandlung
1	Hafer	48	35	8,8	13,7
2	Gerste	48	35	18,7	13,3
3	Weizen	48	35	5,5	6,9
4	Reis	48	17	4,6	3,7
5	Mais	48	35	8,3	15,1
6	Erbsen	48	35	14,7 *)	21,0
7	Erbsenkeime	48	17	10,8	11,5
8	Bohnen	48	35	7,9	18,4
9	Kartoffel	24	35	11,8	19,9
10	Kohlrübe	48	35	7,2	13,5
11	Zwiebel	48	35	9,4	23,2
12	Spinat	50	35	19,7	22,6
13	„ getrocknet	36	35	3,7	5,5
14	Banane	24	17	4,6	19,9
15	Karotten	48	35	11,8	16,8

*) Ein später gewonnenes Dialysat, das unter besonderen Vorsichtsmaßregeln hergestellt war, um Denaturierung zu verhindern, gab sogar 20,0 Gh.

(4,6 Gh) bei Banane überein. Die übrigen mehr oder weniger großen Differenzen erklären sich einerseits aus der Tatsache, daß eben in die Preßsäfte auch solche Stoffe übergehen, die bei Fehlen von Vitaminwirksamkeit doch oberflächenaktiv sind, andererseits aus der Tatsache, daß auch bei der schonenden Dialyse Veränderungen in der Weise vor sich gehen, daß im Dialysat sich die weniger aktive unlösliche Phosphatidfraktion bildet. Hier tritt also schon eine Art Denaturierung ein, so daß der „native" Zahlenwert etwas höher anzunehmen sein wird. In der Tabelle III ist an der Hand eines in der üblichen Weise aus Erbsen gewonnenen Dialysates gezeigt, daß die Oberflächenaktivität der Phosphatide sich in demselben Maße ändert, wie die von anderen Autoren gefundene Vitaminwirkung durch den Einfluß äußerer Faktoren

Tabelle III.

Nr.	Behandlung der Lösung	Δ Oberflächenaktivität
1	Ursprüngliches Dialysat	14,7
2	Gekocht	8,1
3	60 Stunden auf 45° erhitzt	7,6
4	Ultrafiltriert	13,4
5	Nach 60 Stunden im Dunklen	12,0
6	Ebenso lange im zerstreuten Licht	11,6
7	Nach Verdampfen zur Trockne mit Wasser aufgenommen	3,4
8	Durch Tierkohle filtriert	4,2

abnimmt. Das ursprüngliche Dialysat erwies sich als kräftiges Antiberivitamin, das in demselben Maße wie sich die Oberflächenaktivität verringerte, auch immer mehr nach Richtung der Wirksamkeit denaturiert erschien (nach *Hansteen-Cranner*).

Endlich wurde ein natives Phosphatid gespalten und die Spaltungsprodukte gesondert auf ihre Oberflächenaktivität untersucht. Die aus 4 kg Erbsen durch 48stündige Dialyse bei 35° gewonnenen klaren Dialysate der wasserlöslichen Phosphatide wurden tropfenweise mit n/2 Bleiacetatlösung versetzt, wobei die Bleiverbindung des Phosphatids als voluminöser Niederschlag ausfällt. Dieser wurde nach Abfiltrieren im CO_2-Strom und Waschen im Vakuumexsikkator getrocknet, das Filtrat von dieser Fällung zeigte noch als Resultat des Vorhandenseins eines weiteren fällbaren Phosphatids 7,1 Gh, erfahrungsgemäß ist dieses aber so verunreinigt, daß von seiner Reindarstellung vorläufig abgesehen wurde. Die Bleiverbindung erscheint nach dem Trocknen als feines braunes Pulver, das in Wasser unlöslich ist. Sie wurde bei 20° unter Rühren mit der Turbine mit H_2S zerlegt, die abfiltrierte rotbraune klare Lösung, die sich im Tierversuch als B-vitaminös mit starker Wirksamkeit erwiesen hatte, ergab 14,2 Gh, war also so wirksam wie das ursprüngliche Dialysat, und obzwar das im Filtrat erscheinende Phosphatid ebenfalls oberflächenaktiv erschien. Die Oberflächenaktivität des Gesamtdialysats steht also unter komplizierteren Beziehungen als sich etwa durch einfache Summierung ausdrücken ließen. Es könnte aber auch sein, daß durch die Entbleiung eine Anlagerung des H_2S und damit die Entstehung eines oberflächenaktiveren Produkts sich ergeben hat. In der genannten Flüssigkeit wurde nach unserer schon wiederholt beschriebenen Methode mit 5proz. H_2SO_4 unter Erwärmen im Vakuum unter Rückflußkühlung die Spaltung durchgeführt.

Tabelle IV.

Nr.	Fraktion	Gh
1	Ursprüngliche Phosphatidlösung	14,2
	Nach Spaltung mit 5proz. H_2SO_4	10,6
2	Fällung mit Phosphorwolframsäure:	
	a) Cholinchloridanteil	5,5
	b) Adeninchloridanteil	7,2
3	Kohlehydratanteile, ungereinigt	4,6
4	Glycerinsäureanteil	3,6
5	Fettsäurenanteil	—
6	Wässerige Lösung der Farbbasengruppe	3,5

Es zeigt sich also, daß nur das Phosphatid als solches, nicht aber seine Spaltungsprodukte nennenswerte Oberflächenaktivität zeigen. Wenn man den Vitamincharakter der Phosphatide als mit ihrer Oberflächen-

aktivität parallel gehend annehmen will, so kann das Suchen nach Spaltungsprodukten der originalen Vitamine mit analoger Wirksamkeit als durchaus verfehlt bezeichnet werden, wie ja bisher auch tatsächlich kein einziges dieser Spaltungsprodukte als mit ähnlicher Wirksamkeit behaftet gefunden werden konnte, wie sie das originale Vitamin aufweist. Daß vielmehr der Vitamincharakter eines Stoffes mit seiner Kapillaraktivität parallel geht und sich um so mehr verwischt, je stärker durch äußere Einflüsse oder chemische Eingriffe diese verloren geht.

Zusammenfassung.

Die Vitaminwirksamkeit der verschiedensten Pflanzennahrungsstoffe erscheint als Funktion ihrer wasserlöslichen Phosphatide und steht im Zusammenhang mit deren Oberflächenaktivität.

Erst die durch Wasserdialyse bei gewöhnlicher Temperatur gewonnenen Stoffe dieser Art lassen Schlüsse nach dieser Richtung zu, nicht aber die denaturierten, durch chemische Eingriffe dargestellten Zellphosphatide. Ein Verständnis der Vitaminwirkung, welche danach eine Funktion der physikalischen Konstitution der in Rede stehenden Stoffe darstellt, ist daher nicht auf chemischem Wege, sondern nur durch physiologische bzw. physikalisch-chemische Analyse zu erzielen. Für sie ist am allerwenigsten der „Lecithinkern" des Phosphatids als vielmehr die akzessorischen Gruppen verbindlich, welche ebenfalls nur im nativen Phosphatid erscheinen und sich unter anderem als hochmolekulare Kohlehydratgruppen und als zwei Farbstoffkomponenten erwiesen. Außerdem sind es noch verschiedene Elektrolyt- und Nichtelektrolytkombinationen, die hier eine Rolle spielen, während die chemische Analyse in allen Fällen nur den mehr oder weniger intakten Lecithinkern erkennen läßt.

Die Einteilung der Vitamine nach ihrer Wirksamkeit und Lösungsfähigkeit dürfte in der Folge nicht aufrechtzuerhalten sein, da, abgesehen von den vorstehenden theoretischen Erörterungen, die Möglichkeit einer Umwandlung eines und desselben vitaminösen Stoffes nach Richtung seiner Wirksamkeit vorliegt.

Beiträge zum Problem des Blutzuckers.

II. Mitteilung:
Die Kurve der alimentären Hyperglykämie.

Von

H. K. Barrenscheen und **Alfred Eisler.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 23. Juli 1926.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

I.

In der ersten Mitteilung der vorliegenden Reihe[1]) konnten wir über eine Anzahl von Untersuchungen berichten, die im Anschluß an die erstmals von *Winter* und *Smith*[2]) erhobenen Befunde über das verschiedene Verhalten von Polarisation und Reduktion des Blutzuckers bei Normalen durchgeführt worden sind. Die festgestellten Differenzen in beiden Werten deuteten auf das Vorhandensein einer körpereigenen Form der Glucose hin. Eine Aufklärung vom strukturchemischen Standpunkt halten wir bei unseren derzeitigen experimentellen Möglichkeiten für wenig aussichtsreich. Wir haben es daher vermieden, irgend eine präjudizierende Bezeichnung für diese Glucoseform zu benutzen, und glauben, daß der von uns gewählte Ausdruck körpereigene Glucose am ehesten noch dem derzeitigen Stande unseres Wissens entspricht. Auch die Beweiskraft rein qualitativer Reaktionen — wie Verhalten gegen Permanganatlösung usw. — können wir, schon mit Rücksicht auf das komplexe Milieu, nicht als bindend anerkennen. Dagegen möchten wir der Überzeugung Ausdruck geben, daß in erster Linie das biologische Experiment weiteren Aufschluß in dieser Frage zu geben imstande ist. Einen Versuch in dieser Richtung bedeuten die in vitro-Untersuchungen von *Euler* und *Nilsson*[3]) über Vergärung der Hexose aus Glykogen, sowie die Untersuchungen von *R. Kuhn*[4]) über die fermentative Spaltung des Glykogens, welche zeigen, daß bei Um-

[1]) Diese Zeitschr. **167**, 77, 1926.
[2]) Journ. of Physiol. **57**, 100, 1922.
[3]) Hoppe-Seyler **148**, 211, 1925.
[4]) Ber. **57**, 1968, 1924.

setzungen von biolcgischem Material mit anders konfigurierten Zuckern als der gewöhnlichen α-β-Glucose zu rechnen ist.

Weitere Aufschlüsse zur Frage der körpereigenen Glucose erhofften wir uns von einem Studium des Mechanismus der alimentären Hyperglykämie. Scheint uns doch, daß trotz der zahlreichen Arbeiten, die zu dieser Frage erschienen sind, eine einwandfreie, befriedigende Erklärung noch aussteht. Ausgangspunkt für unsere Betrachtungen waren unsere Befunde über den Zusammenhang der Höhe des Polarisationswertes und der alimentären Glykosurie. Wir glaubten, die nach alimentärer Belastung gegenüber den Nüchternwerten gefundenen höheren Polarisationswerte so deuten zu müssen, daß noch nicht assimilierte α-β-Glucose in das Blut übergetreten sei. War diese Auffassung richtig, so mußten wir die bisher vorwiegend geltende Anschauung über die Blutzuckersteigerung nach Zuckerverfütterung einer Revision unterziehen.

II. Zur Technik der Versuche.

Sämtliche Blutzuckerbestimmungen wurden als Doppelbestimmung mit der Methode von *Hagedorn* und *Jensen*[1]) durchgeführt. Ihre Brauchbarkeit wurde von uns sowohl an reinen Zuckerlösungen wie auch an verschiedenen Blutproben wiederholt kontrolliert. In einer größeren Reihe von Versuchen haben wir diese Methode mit der Makrozuckerbestimmung nach *Bertrand*, mit der von *Michaelis*[2]) angegebenen, sowie mit der Methode *Bang II*[3]) und der kolorimetrischen von *Folin* und *Wu*[4]) verglichen. Mit Rücksicht darauf, daß in der letzten Zeit eine Anzahl von Arbeiter[5]) erschienen sind, welche über derartige vergleichende Untersuchungen berichten und deren Ergebnisse sich mit unseren Erfahrungen decken, sehen wir von einer ausführlichen Wiedergabe unseres Zahlenmaterials ab und wollen nur kurz unsere Resultate zusammenfassen:

An reinen Zuckerlösungen ergeben die Methoden von *Michaelis*, *Bang* und *Hagedorn-Jensen* im Bereich der physiologisch in Frage kommenden Konzentrationen Zahlen, welche, gegen die Polarisation und die titrimetrische Bestimmung nach *Bertrand* verglichen, den theoretischen Werten innerhalb der erlaubten Fehlergrenzen entsprechen. Bei Konzentrationen unter 70 mg-Proz. gibt die sonst einwandfreie Methodik von *Folin* und *Wu* keine entsprechenden Werte mehr. Bei Normalbluten sind alle vier verwendeten Methoden als gleichwertig anzusprechen. Durchschnittlich liegen die Zahlen nach *Folin* und *Wu* etwas höher als die nach den anderen Methoden bestimmten. Die Methodik *Michaelis* gibt mit den *Bertrand*-Werten identische Resultate. Bei Diabetikerblut liegen die Verhältnisse ähnlich. Nur ergibt hier die Methodik nach *Folin* und *Wu* in einzelnen Fällen Zahlen, die von den zu erwartenden, mit der Makromethode kor-

---

[1]) Diese Zeitschr. **135**, 48, 1923.
[2]) Ebendaselbst **59**, 166, 1914.
[3]) Mikromethoden. Wiesbaden, Bergmann.
[4]) Journ. of biol. Chem. **41**, 367, 1920.
[5]) Zuletzt *W. S. Duggan* und *E. L. Scott*, Journ. of. biol. Chem. **67**, 287, 1926.

trollierten oft um ein Beträchtliches differieren. Die Differenzen liegen durchweg nach oben und übersteigen oft 50 mg-Proz. Dies deutet wohl darauf hin, daß mit der Methode auch noch andere, nicht zuckerartige Stoffe im Diabetikerblut bestimmt werden[1]). Wir haben die *Hagedorn*sche Methodik in ihrer ursprünglichen Form ohne jede Modifikation verwendet und möchten als wesentlichen Vorteil gegenüber der sonst meist geübten *Bang*schen Methode, abgesehen von der größeren Zuverlässigkeit, ganz besonders auf die große Zeitersparnis hinweisen, welche die Anwendung dieser Methode gerade bei Serienuntersuchungen mit sich bringt. Bei einiger Übung ist es ein Leichtes, 16 bis 20 Blutzuckerbestimmungen innerhalb einer Stunde auszuführen.

Die Blutentnahmen erfolgten aus der Fingerbeere nach heißem Handbad. Die ohne Druck hervorquellenden Bluttropfen wurden auf Uhrschälchen, die mit einer Spur Kaliumoxalat bestreut waren, aufgefangen. Einen Einfluß dieser geringen Menge von Oxalat auf die Blutzuckerwerte konnten wir nicht feststellen. Alle Versuche wurden an stoffwechselgesunden Studenten und Ärzten des Laboratoriums, die zum Teil mehrfach untersucht wurden, ausgeführt. Entsprechend den heutigen Verhältnissen befanden sich alle in gutem Ernährungszustand. Die Zeit zwischen der letzten Mahlzeit (gewöhnliche, gemischte Abendmahlzeit) und dem Versuch betrug 12 bis 14 Stunden. Während des Versuchs wurde von den Versuchspersonen keine irgendwie nennenswerte körperliche Arbeit geleistet. Die Glucosemengen betrugen 20 bzw. 100 g. In einer Anzahl von Versuchen gaben wir 1 g pro Kilogramm Körpergewicht, in einer weiteren Versuchsreihe wurden zweimal 20 bzw. 20 und 100 g Glucose in Abständen von 30 bis 60 Minuten nach der ersten Zuckergabe verabreicht. Die Glucose war in den allerersten Versuchen gewöhnlicher, käuflicher Traubenzucker, später reine, wasserfreie Glucose *Kahlbaum*. Der Zucker wurde meist in Tee gelöst verabreicht, die Flüssigkeitsmengen betrugen in den Versuchen mit 20 g 150 ccm, in den Versuchen mit größeren Mengen 250 ccm. Der Harn wurde in allen Fällen auf alimentäre Glykosurie untersucht, in keinem konnte eine Zuckerausscheidung festgestellt werden.

III. Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in den Tabellen I bis IV zusammengestellt. Dabei sind die Versuche, die an derselben Person durchgeführt wurden, mit der gleichen Versuchszahl ausgewiesen.

Betrachten wir zunächst die Versuche mit 20 g Glucose. Wenn wir von zwei Fällen (Tabelle I, Nr. 8a und 9) absehen, die eine ausgesprochene psychische Hyperglykämie zeigen, so können wir die Ergebnisse der *Staub*schen[2]) Arbeit bestätigen. Der absolute Anstieg beträgt in diesen acht Fällen zwischen 12 und 32 mg, im Durchschnitt 23 mg. Den maximalen Anstieg finden wir nach 15 Minuten in einem Falle (Versuch 1), in sieben Fällen nach 30 Minuten (Versuch 4, 5, 6, 7, 8, 8a, 9), nach 45 Minuten in zwei Fällen (Versuch 2, 3). Der Ausgangswert ist in drei Fällen (Versuch 4,

[1]) In einer kürzlich erschienenen Arbeit (Journ. of. biol. Chem. **67**, 357, 1926) weist *Folin* selbst anläßlich einer Verbesserung seiner Lösung auf diese Differenzen bei der ursprünglichen Methode hin und erörtert die Möglichkeit, daß diese zu hohen Werte bei Diabetikern durch polymere Kohlehydrate (Maltose) bedingt sein können.

[2]) Zeitschr. f. klin. Med. **91**, 44, 1921.

Tabelle I.

Versuche mit 20 g Glucose.

Name	Nr.	Zeit in Minuten										Anstieg		Abfall	
		0	15	30	45	60	75	90	120	150	180	abs.	proz.	abs.	proz.
Fr.	1	110	128	123	115	105	107	101	100	107	103	18	16	10	9
Kap.	2	87	92	106	116	106	104	85	87	83	90	29	33	4	5
Kr.	3	106	111	121	132	123	106	—	92	88	90	26	24	18	17
Dol.	4	106	109	119	99	102	90	80	79	82	81	13	12	27	25
Fe.	5	119	122	131	111	115	111	104	97	95	92	12	10	27	23
Trn.	6	96	117	122	121	103	96	103	85	85	—	26	27	11	11
Dt.	7	95	122	128	104	93	93	97	93	95	—	33	35	2	2
Eis.	8	113	152	164	118	124	118	140	120	140	138	51	45	0	0
Eis.	8a	93	113	120	92	115	101	108	94	92	93	27	29	0	0
Ba.	9	90	132	165	115	118	103*)	90	110**)	100	95	75	83	0	0

*) Von diesem Wert aus Entnahme in 20-Minuten-Intervall.

**) Von da ab Entnahme in 30-Minuten-Intervall.

5, 8a) nach 45 Minuten bereits erreicht oder unterschritten, in zwei Fällen nach 60 Minuten (Versuch 1, 7), nach 75 Minuten in zwei Fällen (Versuch 3, 6), nach 90 bzw. 95 Minuten in je einem Falle (Versuch 2 bzw. 9) und wird in einem Falle (Versuch 8) überhaupt nicht erreicht. In fünf Fällen finden wir eine ausgesprochene Hypoglykämie (Versuch 1, 3, 4, 5, 6), während die andere Hälfte der Versuche diese vermissen läßt. Der Abfall unter den Ausgangswert beträgt maximal 27 mg, durchschnittlich 12,5 mg. Eine Abhängigkeit der Höhe der Hyperglykämie von der Höhe des Ausgangswerts läßt sich nicht feststellen, dagegen besteht zwischen der Dauer der Erhebung der Kurve über den Ausgangswert und der darauffolgenden Hypoglykämie insofern eine Beziehung, als die Hypoglykämie umgekehrt proportional ist zur Dauer und bis zu einem gewissen Grade auch zur Höhe des Anstiegs. Besondere Beachtung möchten wir der in einer Anzahl von Kurven festgestellten zweiten Zacke schenken, die wir bei einigen Individuen ganz regelmäßig, auch bei wiederholter Untersuchung feststellen konnten. Zum Teil handelt es sich um ausgesprochene zweigipflige Kurven, zum Teil sehen wir eine zweite Zacke nach bereits erreichtem Abfall wieder auftreten[1]). Es scheint sich hier um eine individuelle Eigentümlichkeit zu handeln, die sich auch bei Variierung der Zuckerdosis deutlich ausprägt. Auf eine mögliche Erklärung dieser zweiten Zacke kommen wir im weiteren Zusammenhang zu sprechen.

In Tabelle II sind die Ergebnisse von 13 Versuchen zusammengestellt, und zwar geordnet nach den Zuckergaben (von 35 bis 100 g).

Vergleichen wir die Werte in dieser Tabelle mit den in der ersten erhaltenen, so sehen wir, daß konform mit den *Staub*schen Angaben und entgegen den Befunden von *Mac Lean* und *de Wesselow*[2]) die Höhe des Anstiegs mit der Dosis parallel geht, doch ist dieser Parallelismus für dasselbe Individuum nicht immer abzulesen (vgl. Tabelle I, Fall 8, 9; Tabelle II, Fall 8a, 9a). Es scheint hier die augenblickliche körperliche und psychische

[1]) *Staub* (Zeitschr. f. klin. Med. **98**, 123, 1922) beschreibt bei seinen Arbeitskurven ebenfalls eine solche zweite Zacke als „Nachschwankung".

[2]) Quaterl. Journ. of Med. **14**, 103 bis 119, 1921.

Tabelle II.

Versuche mit 35 bis 100 g Glucose.

Name	Nr.	Zeit in Minuten													Anstieg		Abfall		Bemerkungen
		0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	abs.	proz.	abs	proz.	
Eis.	8b	109	128	130	140	119	114	96	114	81	93	102	—	—	31	28	25	23	Die ersten sechs Werte in 10, die übrigen in 20 Min. Abstand. 35 g Glucose.
Str.	10	116	—	147	133	110	—	100	—	99	—	100	—	100	31	27	17	15	40 g Glucose
Pop.	11	100	149	175	182	162	137	100	90	—	77	—	107	112	82	82	23	23	Der siebente bis neunte Wert in 20, die restlichen in 30 Min. Abstand. 60 g Glucose.
Dol.	4a	82	111	135	120	123	128	104	—	—	73	—	79	84	53	65	9	11	65 g Glucose
Sal.	12	112	107	133	137	149	129	—	125	—	118	—	117	—	37	33	0	0	65 g Glucose
Leip.	13	87	102	156	151	135	119	127	104	—	71	—	89	104	69	79	16	18	Der siebente bis neunte Wert in 20, der zehnte und elfte Wert in 30 Min. Abstand. 70 g Glucose.
Bar.	9a	95	135	162	152	138	116	97	64	—	59	—	70	—	67	71	36	38	Die drei letzten Werte im Abstand von 20 Minuten. 80 g Glucose.
Bar.	9b	99	155	174	166	143	139	126	85	—	62	—	75	77	75	76	37	37	Die Zeiten wie in Versuch 11 und 13. 80 g Glucose
Fr.	1a	102	110	120	127	125	118	124	—	97	—	95	—	101	25	25	7	7	100 g Glucose.
Kr.	3a	115	173	186	177	—	115	102	—	104	—	88	—	90	71	62	27	23	100 g Glucose
Eis.	8c	116	119	135	134	119	116	121	101	98	95	83	88	—	19	16	33	28	Die ersten sieben Werte in 10, die restlichen in 20 Minuten Abstand. 100 g Glucose
Str.	10a	124	168	—	146	138	—	106	—	72	—	75	—	75	44	35	52	42	100 g Glucose
Gel.	14	104	136	146	131	119	99	104	—	93	—	93	—	92	42	40	12	12	100 g Glucose

Verfassung eine wesentliche Rolle zu spielen. Diese Befunde mahnen zu einer besonderen Vorsicht und Rücksichtnahme auf die augenblickliche Lage der Gesamtpersönlichkeit bei der Beurteilung der Blutzuckerkurve. Die Höhe des Anstiegs beträgt in diesem Versuch zwischen 19 bis 82 mg-Proz., durchschnittlich 50 mg-Proz. Das Maximum wird zwischen 15 und 75 Minuten erreicht, die Durchschnittszeit verschiebt sich unwesentlich gegen die nach 20 g Glucose beobachtete. Dort ergeben sich durchschnittlich 32, hier 36 Minuten bis zur Erreichung des Gipfels der Kurve. Deutlicher prägt sich der Einfluß der höheren Dosis in der Dauer der Hyperglykämie aus; der Ausgangswert wird, gegenüber einem Mittelwert von 65 Minuten in den Versuchen der Tabelle I, erst durchschnittlich nach 95 Minuten erreicht. Ebenso wie die Dauer der Hyperglykämie wird aber auch die folgende Hypoglykämie durch die Dosis wesentlich beeinflußt, und zwar läßt sich feststellen, daß im allgemeinen die Größe des Abfalls der Zuckermenge proportional geht. Der absolute Abfall beträgt, wenn wir von Fall 12 absehen, der eine Sonderstellung einnimmt, zwischen 7 und 52 mg, im Durchschnitt 24,5 mg. Auch hier verweisen wir wieder auf die bereits bei Besprechung der 20-g-Versuche hervorgehobene, zweite Zacke, die in einzelnen Fällen ganz besonders schön in Erscheinung tritt.

Vom theoretischen Standpunkt ist der Einfluß wiederholter Zuckergaben auf den Blutzuckerspiegel von ganz besonderem Interesse. Bereits *Bang*[1]) hat diesem Gegenstand sein Augenmerk zugewandt, In einer ausführlichen Arbeit von *Böe*[2]) aus dem *Bang*schen Laboratorium wurde er einer weiteren eingehenden experimentellen Prüfung unterzogen. In neuerer Zeit hat die Frage durch die Arbeiten von *Staub, Traugott*[3]), *Mac Lean* und *de Wesselow* erneutes Interesse wegen der eventuellen Bedeutung für die Beurteilung der Assimilationsfähigkeit gewonnen. Mit Rücksicht auf die praktische und vielleicht noch größere theoretische Bedeutung dieser Frage haben wir eine Reihe von Untersuchungen auch in dieser Richtung vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt.

In zehn Fällen wurden zweimal 20 g Glucose in Abständen von 30 Minuten bis zu einer Stunde gegeben. Drei Fälle erhielten 20 und 100 g Glucose im Abstand von einer Stunde. Nehmen wir zunächst die Fälle, in welchen die zweite Glucosegabe nach 30 Minuten, noch im aufsteigenden Ast der Kurve, gereicht wurde, so zeigt sich der Einfluß in dem einen Falle (8b) höchstens in einem leicht protrahierten Abfall, doch ist auch der bei Berücksichtigung des verschiedenen Verhaltens dieser Versuchsperson zu verschiedenen Zeiten (s. Tabelle I, Versuch 8 und 8a) nicht deutlich ausgesprochen. Im Falle 4b bewirkt die zweite Zuckergabe, auf der Höhe der Hyperglykämie gegeben, nur einen leichten Anstieg um 9 mg in 30 Minuten, der Abfall ist hier deutlich protrahiert[4]). Ganz anders wirkt sich die neuerliche Zuckerzufuhr im Falle 2a aus, bei dem diese nach 45 Minuten, bereits im Abfall auf die Hypoglykämie, gegeben wurde. Wir sehen einen deutlichen zweiten Anstieg, der ebenso wie der erste in 30 Minuten

[1]) Monographie, S. 57.
[2]) Diese Zeitschr. 58, 106, 1914.
[3]) Klin. Wochenschr. Jahrgang 1922, S. 892.
[4]) Vgl. dazu das analoge Ergebnis in dem einen Versuch von *Bang*, Monographie, S. 58, Kurve 1.

Tabelle III.

Versuche mit wiederholter Zuckergabe.

ne	Nr.	Zeit in Minuten													Bemerkungen
		0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	
l.	4b	92	123	150*)	154	159	137	90	66	75	—	86	—	88	2 × 20 g
).	8d	94	99	132*)	110	95	81	74	84	75	—	73	—	—	Ebenso
p.	2a	105	152	155	88*)	129	141	102	83	76	—	74	—	97	"
	1b	92	136	131	85	85*)	121	111	101	88	84	78	88	77	"
).	8e	107	144	137	104	101*)	118	111	105	71	66	90	83	82	"
	14a	113	134	108	93	97*)	119	119	105	108	89	108	113	97	"
).	15	120	133	167	113	87*)	96	140	132	87	78	105	103	109	"
).	16	95	127	127	90	88*)	104	113	113	104**)	—	—	—	—	"
g.	17	93	106	117	100	81*)	109	120	89	83	101	120	113	89	"
b.	18	110	132	140	102	125*)	138	130	134	125	102	97	95	83	"
).	8f	93	110	112	75	60*)	106	139	116	97	111	117	143	108	20 u. 100 g
p.	11a	99	124	141	147	121*)	136	182	164	144	129	121	81	63†)	Ebenso
	19	103	121	101	110	107*)	128	112	130	—	109	110	104	105††)	"

*) Unmittelbar nach diesem Wert die zweite Zuckergabe. — **) Versuch vorzeitig abgebrochen. — †) Die letzten drei Entnahmen halbstündig. — ††) Der letzte Wert nach 30 Minuten.

sein Maximum erreicht, hinter dem absoluten Wert des ersten Anstiegs jedoch um 14 mg zurückbleibt. Der darauf folgende Abfall ist bedeutend mächtiger als der nach einmaliger Zuckergabe von 20 g erzielte (s. Tabelle I, Fall 2). In sieben Fällen, in welchen die erneute Zuckerzufuhr der ersten eine Stunde nachfolgte, sind wir — mit Ausnahme von Fall 18, bei dem wir in den Anstieg der zweiten Zacke kamen und der so analoge Verhältnisse wie Fall 4b zeigt — durchweg in die hypoglykämische Phase gekommen, und zwar war der Blutzucker in diesen Fällen um 6 bis 28 Proz., im Durchschnitt um 12,4 Proz. gegen den Ausgangswert abgefallen. Der Höhepunkt des zweiten Anstiegs wird in all diesen Fällen nach derselben Zeit erreicht, wie der Gipfel nach der ersten Zuckergabe. Der Anstieg nach der zweiten Zuckergabe ist, von Fall 17, 18 abgesehen, wo er höher bzw. innerhalb der Fehlergrenzen gleich dem ersten gefunden wurde, durchweg gegen den Ausgangswert niedriger, entsprechend den Angaben von *Staub*, *Traugott* und *Mac Lean*. Während im Durchschnitt von den sieben Fällen der erste Anstieg gegen den Nüchternwert 33,4 mg beträgt, ist die Erhebung nach der zweiten Zuckergabe nur 19,8 mg. Dieser geringe Anstieg auf neuerliche Zuckerzufuhr ist jedoch nur ein scheinbarer, und wir glauben, daß die Schlüsse, die aus diesem Verhalten gezogen wurden, zum Teil aus einer nicht ganz korrekten Betrachtungsweise hervorgegangen sind. Geht man nämlich nicht von dem Nüchternwert, sondern von dem der zweiten Zuckergabe unmittelbar vorangehenden Werte aus — und nur diese Betrachtungsweise scheint uns richtig zu sein —, so kommt man zu ganz anderen Ergebnissen und damit auch zu anderen Schlußfolgerungen für die Theorie. Bei dieser Betrachtungsweise zeigt sich nämlich, daß die absolute Differenz in der Mehrzahl der Fälle sogar höher liegt als die nach der ersten Zuckergabe erreichten Werte. Als Durchschnitt aus allen sieben Fällen errechnet sich bei dieser Betrachtung eine Zunahme von 29,5 mg, und sehen wir von Fall 18 ab, so wird der Wert mit 32,3 mg dem durch die erste Zuckergabe erreichten praktisch vollkommen gleich. Wenn wir statt der absoluten für alle Fälle die prozentische Zunahme rechnen, so finden wir für beide

Maxima die gleiche mittlere Zunahme um 33 Proz. [1]). Zur besseren Übersicht der Verhältnisse sind die einzelnen Zahlen für sämtliche Fälle in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Anstieg und Abfall in den Versuchen mit wiederholter Glucosegabe.

Name	Nr.	Nüchternwert	I. Anstieg		I. Abfall		II. Ausgangswert	II. Anstieg		Gesamtabfall	
			abs. mg	proz.	abs.	proz.	mg	abs.	proz.	abs. mg	proz.
Dol.	4b	92	58	63	0	0	150	9	6	26	28
Eis.	8d	94	38	40	0	0	132	0	0	21	22
Kap.	2a	105	50	48	17	16	88	53	60	31	30
Fr.	1b	92	44	48	7	8	85	36	42	15	16
Eis.	8e	107	37	35	6	6	101	19	19	41	38
Gel.	14a	115	21	19	20	18	97	22	23	24	21
Sch.	15	120	47	39	33	28	87	53	61	42	35
Sch.	16	95	32	34	7	7	88	25	28	—	—
Eng.	17	93	24	26	12	13	81	39	49	—	—
Silb.	18	110	30	27	8	7	125	13	10	27	25
Eis.	8f	93	19	20	33	35	60	73	111	—	—
Pop.	11a	99	48	48	—	—	121	61	50	36	36
J.	19	103	18	17	2	2	107	21	20	—	—

Noch eines geht aus dieser Zusammenstellung hervor. Das ist der beträchtliche Einfluß, welchen die zweite Zuckergabe auf die folgende Hypoglykämie ausübt. Hier wird der Unterschied bei Berücksichtigung des Nüchternwertes besonders deutlich. Während wir in unseren Fällen in Tabelle I einen durchschnittlichen Abfall von 11,5 berechneten, ergibt sich hier ein solcher von 27 Proz., also noch höher als der in den Versuchen mit 35 bis 100 g errechnete (s. Tabelle II). Die drei Versuche, in welchen wir 100 g Glucose eine Stunde nach 20 g gaben, zeigen kein einheitliches Bild. Am ehesten entspricht noch Fall 19 den Angaben der Literatur. Hier wurde die zweite Zuckergabe zu einer Zeit gereicht, in der der Nüchternwert annähernd erreicht war. Der darauf folgende Anstieg ist, wenn wir von unserer Betrachtungsweise ausgehen, mit 23 mg nur wenig verschieden von dem Anstieg nach der geringeren Zuckergabe. Im Falle 11a scheint die vorausgehende Zuckergabe Höhe und Dauer der Hyperglykämie überhaupt nicht zu beeinflussen, möglicherweise haben wir ähnliche Verhältnisse getroffen wie in Fall 4b. Der auffallend protrahierte Verlauf der Kurve spricht in diesem Sinne. Fall 8 f läßt auch in dieser Versuchsanordnung den der Versuchsperson eigenen Typus der zweizackigen Kurve erkennen.

IV. Der Mechanismus der alimentären Hyperglykämie.

Die heute allgemein gültige Theorie über die Ursachen der alimentären Hyperglykämie geht dahin, daß die Blutzuckersteigerung von dem resorbierten zugeführten Zucker herrührt. Diese Anschauung wird in

[1]) Zu gleichen Ergebnissen führt eine nähere Betrachtung des von *Mac Lean* und *de Wesselow* in Kurve 2 mitgeteilten Versuchs, bei dem im Abstand von 1½ Stunden je 50 g Glucose gegeben wurden. Wir begnügen uns mit der Wiedergabe der Zahlen: 1. Anstieg von 90 auf 172 mg, d. i. um 82 mg, 2. Anstieg von 75 auf 155 mg, d. i. um 80 mg.

neuerer Zeit in den Arbeiten von *Staub*, *Mac Lean*, *Folin* und *Berglund* und *Foster* vertreten. Auch *Leo Pollak*[1]) schließt sich in seinem ausführlichen Referat dieser Meinung an. Die Möglichkeit, daß die Hyperglykämie auch durch eine Reizwirkung des zugeführten Zuckers bedingt sein könnte, wird von *Staub* nur für seine Karenzfälle diskutiert. Die gegen die Normalfälle beobachtete Blutzuckersteigerung führt *Staub* hier auf Mobilisation des Leberglykogens und Resorption des zugeführten Zuckers zurück. In einer mittleren Linie bewegen sich zum Teil die Anschauungen von *Folin* und *Berglund*, welche neben der Resorption eine Reizwirkung als möglich diskutieren. Gegen die Anschauung über die alleinige Bedeutung der Resorption haben *Eisner* und *Förster*[2]) einige bemerkenswerte Einwände erhoben. Sie machen auf den außerordentlich raschen Anstieg des Blutzuckers nach Kohlehydratzufuhr (Stärke) aufmerksam und nehmen an, daß die Kohlehydrate durch einen spezifischen Reiz, den sie auf die Schleimhaut des Magen-Darmkanals ausüben, die Leber zur Ausschüttung ihres Depots veranlassen.

Die Hypoglykämie ist nach unseren Befunden beim Normalen mit wenigen Ausnahmen bei genügend langer Versuchszeit regelmäßig zu beobachten. Sie findet sich gelegentlich schon in der älteren Literatur erwähnt, so bei *Bönniger* und *Frank*[3]) und bei *Bang*. Auf ihr regelmäßiges Vorkommen verweist ganz besonders *Folin* und *Berglund*. *Staub* erwähnt ihrer nur bei seinen Arbeitsversuchen. Nach ihm ist sie Ausdruck vermehrten Zuckerverbrauchs durch die Muskulatur infolge gesteigerten Verbrauchs während der Arbeitsleistung. *Folin* und *Berglund* sehen in ihr das Zeichen einer gesteigerten Adsorption durch das Gewebe, *Foster* erklärt sie durch eine Steigerung und Aktivierung der Glykogenbildung. Bevor wir unsere Anschauung zu diesen Fragen präzisieren, möchten wir auf unser eigenes Versuchsmaterial zurückkommen.

Aus unseren Fällen lassen sich unschwer zwei Extreme erfassen, die wir in Abb. 1 und 2 graphisch wiedergeben. In dem einen Falle (Abb. 1, Tabelle II, Fall 3a) sehen wir einen rapiden Anstieg, der von einem ebensolchen Abfall und einer ausgesprochenen Hypoglykämie gefolgt

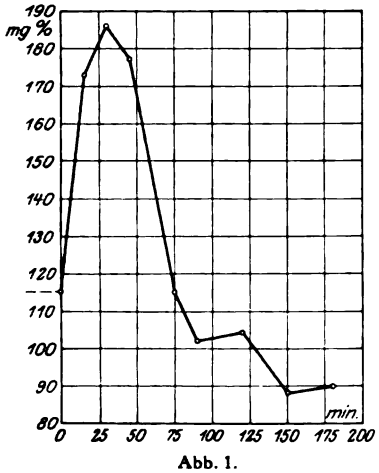


Abb. 1.
(Siehe Tabelle II, Fall 3a.)

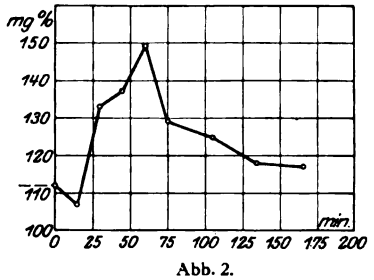


Abb. 2.
(Siehe Tabelle II, Fall 12.)

[1]) Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **23**, 337, 1923.
[2]) Berl. klin. Wochenschr. 1921, S. 839.
[3]) H. S. **70**, 1911.

wird. Wir wollen diesen Typus als Assimilationstyp bezeichnen und stellen ihm den zweiten Typus gegenüber (s. Abb. 2, Tabelle II, Fall 12). Hier finden wir protrahierten Anstieg, flachen Verlauf der Kurve, protrahierten Abfall, Fehlen der Hypoglykämie. Wir bezeichnen diesen Typ als Resorptionstyp. Unter Zugrundelegung dieser Typen möchten wir unsere Auffassung über den Mechanismus der alimentären Hyperglykämie wie folgt entwickeln. Für die Fälle vom Typus 1 ist die Blutzuckersteigerung bedingt durch eine Reizwirkung des zugeführten Zuckers, welche zur Glykogenmobilisation führt. Wie diese Reizwirkung zustande kommt, darüber sind mehrere Anschauungen möglich. Man könnte, entsprechend der von *Eisner* und *Förster* gegebenen Erklärung an einen von der Darmwand ausgehenden Reiz denken, welcher reflektorisch das Leberglykogen mobilisiert. Hier wäre aber auch an die Befunde von *Müller* und *Petersen*[1]) zu denken, welche für das subkutan injizierte Insulin in erster Phase eine zuckermobilisierende Wirkung feststellten. Man könnte sich nun vorstellen, daß der eingeführte Zucker von der Darmwand aus reflektorisch den Inselapparat beeinflußt, und daß die erhöhte Aktivität dieses sich zunächst in einer vermehrten Mobilisation von Zucker auswirkt. Eine dritte Möglichkeit wäre die, daß der mit dem Portalblut der Leber zuströmende körperfremde Zucker den Reiz für die Glykogenmobilisation abgibt. Die Annahme einer Reizwirkung läßt auch verstehen, warum die Höhe des Anstiegs der Konzentration des zugeführten Zuckers parallel geht, die Dauer bis zur Erreichung des Maximums jedoch kaum verschoben wird. Auch den von *Staub* nach Zufuhr von Glucose durch die Duodenalsonde beobachteten höheren Anstieg der Blutzuckerkurve möchten wir im Gegensatz zu *Staub* als eine durch die höhere Konzentration bedingte stärkere Reizwirkung auffassen. Daß bei den höheren Zuckergaben nicht die größere Resorption den höheren Anstieg bedingt, geht aus den Versuchen von *Cori*[2]) hervor, nach denen sich die Resorptionsgröße unabhängig von der zugeführten Menge und der Konzentration des Zuckers erweist. Der mobilisierte körpereigene Zucker wäre es dann, welcher die erste Steigerung bedingt und vielleicht auch in der Peripherie als Reiz für die Assimilation im weitesten Sinne des Wortes wirkt. Die nun aktivierte Assimilationsfähigkeit ist letzten Endes auch die Ursache für den Abfall der Blutzuckerkurve zur Norm und auf hypoglykämische Werte. Die Hypoglykämie würde demnach ebenso für die Assimilationsfähigkeit sprechen, wie der rasche Abfall der Kurve zur Norm. Die absolute Höhe des Anstiegs hat beim Normalen mit der Assimilationsfähigkeit nichts zu tun, wohl aber ist nach dieser Auffassung die Zeit, innerhalb der der Gipfel erreicht wird, von Bedeutung.

Der zweite Typus, die Resorptionskurve, zeigt in seinem ganzen Verhalten das absolute Gegenspiel der Assimilationskurve. In dem langsamen protrahierten Anstieg sehen wir den Ausdruck für die Resorption bei fehlender Mobilisation, in dem verzögerten Abfall das relative Versagen der peripheren Assimilation, für deren Anregung der adäquate Reiz fehlt.

Zwischen diesen beiden Extremen finden wir nun alle möglichen Übergänge. Der häufigste Typus sind jene Fälle, in denen bei anscheinend intakter Reizmobilisation die Assimilation mehr oder weniger verzögert ist, und nun die Resorption sich der Mobilisationshyperglykämie superponiert:

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1926, Nr. 18.
[2]) Journ. of biol. Chem. **66**, 691, 1925.

rascher Anstieg, protrahierter Abfall, geringe Hypoglykämie (s. Abb. 3, Versuch 13, Tabelle II). Ein weiterer Typus, auf den wir bereits mehrfach hingewiesen haben, sind jene Fälle, bei denen die Kurve zwei Gipfel oder eine zweite, nach Erreichung des Ausgangswerts auftretende Zacke zeigt (s. Abb. 4 und 5). Wir möchten in dieser zweiten Zacke den Ausdruck einer relativen Insuffizienz der peripheren Assimilation und eines dadurch bedingten Überwiegens der Resorption erblicken und bezeichnen diese zweite Zacke als Resorptionszacke. Mit dieser hier vorgebrachten Anschauung lassen sich auch die in den Versuchen mit wiederholter Zuckergabe erhobenen Befunde zwanglos erklären. Man hat den — gegen den Ausgangs-

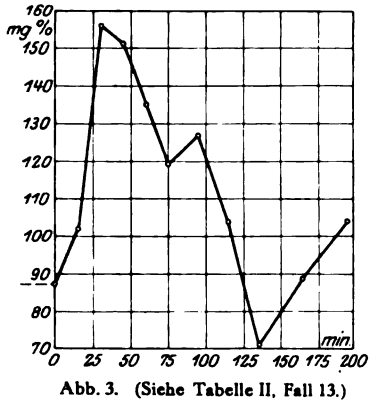


Abb. 3. (Siehe Tabelle II, Fall 13.)

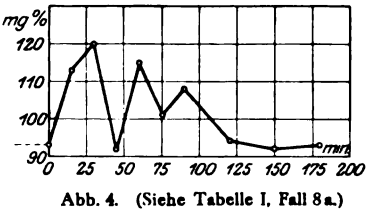


Abb. 4. (Siehe Tabelle I, Fall 8a.)

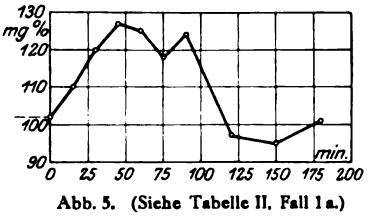


Abb. 5. (Siehe Tabelle II, Fall 1a.)

wert — niedrigeren zweiten Anstieg bisher allgemein als Ausdruck einer Bahnung der Assimilation angesprochen. Auf Grund der früher vorgebrachten Einwände gegen diese Betrachtungsweise und mit Rücksicht auf unsere Ergebnisse möchten wir folgende Anschauung entwickeln. Fällt die zweite Zuckergabe in den aufsteigenden Ast der Kurve, so ist der primäre Reiz noch wirksam. Wir kommen gewissermaßen in eine refraktäre Phase, der Erfolg auf die Blutzuckerkurve äußert sich in einem langsameren Abfall, wie er nach einer von Anfang an gegebenen größeren Dosis zu erwarten ist. Trifft die erneute Zuckermenge in eine Zeit, in der der Ausgangswert bereits erreicht oder unterschritten ist, dann verhält sich die zweite Steigerung in Höhe und Dauer wie wenn vorher kein Zucker gegeben worden wäre: Gleiche Reize haben den gleichen Effekt.

Zusammenfassung.

1. Höhe und Dauer der alimentären Hyperglykämie nehmen mit der Menge des zugeführten Zuckers zu. Die Zeit, innerhalb welcher der Gipfelpunkt erreicht wird, ist individuell konstant und unabhängig von der Größe der Zuckergabe. Bei entsprechender Versuchsdauer läßt sich beim Normalen regelmäßig eine alimentäre Hypoglykämie nachweisen.

2. Die Wirkung einer zweiten Zuckergabe auf die Blutzuckerkurve ist abhängig von der Phase, in welcher die neuerliche Zuckerzufuhr erfolgt.

3. Es werden zwei Typen der Blutzuckerkurve aufgestellt: Der Assimilationstyp ist durch steilen Anstieg, steilen Abfall, starke Hypoglykämie charakterisiert. Im Gegensatz zu ihm verläuft die Kurve des Resorptionstyps flach und protrahiert ohne nennenswerte Hypoglykämie. Die Hyperglykämie beim Assimilationstypus dürfte auf eine Reizwirkung durch den zugeführten Zucker, die zu einer Ausschüttung körpereigener Glucose führt, zurückzuführen sein.

Beiträge zum Problem des Blutzuckers.

III. Mitteilung:
Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 1. Methodik.

Von

H. K. Barrenscheen, Friedrich Doleschall und **Ludwig Popper.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 23. Juli 1926.)

I.

Seit den grundlegenden Arbeiten von *Iwanoff*[1]), *Harden* und *Young*[2]) sowie *Embden* und seiner Schule[3]), welche erstmals den Nachweis für das Vorkommen von Kohlehydratphosphorsäureestern erbracht und auf ihre Bedeutung im intermediären Kohlehydratstoffwechsel hingewiesen haben, ist die Frage nach der gegenseitigen Wechselwirkung der Glucose und Phosphorsäure wiederholt Gegenstand theoretischer Erörterung und experimenteller Untersuchung gewesen. Die Annahme, daß sowohl der Aufbau als auch der Abbau der Kohlehydrate im Organismus den Weg über die Phosphorylierung gehen muß, daß somit diese gewissermaßen als Kreuzungspunkt im Zentrum des intermediären Kohlehydratstoffwechsels steht, dürfte heute wohl allgemeine Geltung haben. Im Laufe unserer Untersuchungen über die Physiologie des Blutzuckers hat sich uns nun die Überzeugung aufgedrängt, daß die Betrachtung der Blutzuckerkurve allein nur oberflächlich über den Vorgang der Assimilation und das Schicksal des zugeführten Zuckers zu orientieren vermag.

Von vergleichenden Untersuchungen der Blutzuckerkurve und der Kurve des anorganischen und des gesamtsäurelöslichen Phosphors hofften wir einen näheren Einblick in den Mechanismus der Zuckerassimilation im weitesten Sinne des Wortes gewinnen zu können.

---

[1]) *Iwanoff*, Hoppe-Seyler 50, 281, 1907.

[2]) *Harden* und *Young*, Proz. Roy. Soc. 80, 209, 1908; diese Zeitschr. 32, 172, 1911.

[3]) *Embden* und *Laquer*, ebendaselbst 98, 181, 1917; Hoppe-Seyler, 113, 1, 1921.

Während die Kurve der anorganischen Phosphorsäure in ihrem Verhältnis zur Blutzuckerkurve in einigen Arbeiten bereits untersucht wurde[1]), ist das Verhalten des gesamtsäurelöslichen Phosphors bisher noch nie Gegenstand systematischer Untersuchungen gewesen[2]). Gerade von einer Verfolgung dieser Werte erhofften wir jedoch einigen Aufschluß zu erhalten, da wir der Meinung waren, daß die intermediär auftretenden Kohlehydratzwischenprodukte zum Teil in dieser Fraktion sich finden müssen, und wir glaubten, auf diese Weise einen Einblick in deren Synthese und Transport gewinnen zu können.

II. Zur Technik der Phosphorsäurebestimmung.

Für eine derart geplante Untersuchungsreihe, welche mit ausgedehnten Serienuntersuchungen rechnete, mußten wir uns die entsprechende Technik erst zurechtlegen.

Zur Bestimmung kleinster Mengen Phosphorsäure besitzen wir eine ganze Reihe gut ausgebildeter Methoden. Die exakteste Methode ist von *Pregl*[3]) ausgearbeitet und wurde auf Veranlassung von *Elias* durch *Stella Wiener*[4]) auf das Serum übertragen. Für Serienuntersuchungen ist sie jedoch zu langwierig und zeitraubend, erfordert auch relativ große Mengen von Blut. Die gleichen Einwände schlossen auch die Anwendung der von *Embden*[5]) angegebenen gravimetrischen Methode (Fällung der Phosphorsäure als Strychninmolybdat) aus. Versuche, die *Embden*sche Methodik in eine titrimetrische Bestimmung umzuwandeln, führten nicht zu dem gewünschten Grad von Genauigkeit. Mangels eines Nephelometers mußten wir uns also auf eine der üblichen kolorimetrischen Methoden beschränken. Von diesen haben wir die Methoden von *Bell* und *Doisy*[6]) in der Modifikation von *Briggs*[7]), sowie von *Benedict* und *Theis*[8]), ferner die von *Tisdall*[9]) und die von *Terada*[10]) angegebenen einer Nachprüfung unterzogen. Wir haben uns zum Schluß für die von *Tisdall* angegebene Methodik entschieden, deren Brauchbarkeit theoretisch auch durch die eingehenden Untersuchungen von *Kleinmann*[11]) erwiesen ist und die für unsere Zwecke aus

---

[1]) Wir werden auf diese Arbeiten in unseren weiteren Veröffentlichungen noch zurückkommen.

[2]) Einzig *Lawaczeck* (Klin. Wochenschr., Jahrg. 1925, S. 1858) hat in einer nach Beginn der vorliegenden Untersuchungen erschienenen Arbeit sich mit dem Verhalten des Lactacidogens nach Kohlehydratzufuhr beim Normalen und Diabeteskranken beschäftigt. Das Lactacidogen dürfte allerdings kaum das einzige phosphorhaltige Kohlehydratzwischenprodukt sein, das in Frage kommt.

[3]) *Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse. Berlin, Springer 1923.

[4]) Diese Zeitschr. **115**, 42, 1921.

[5]) Hoppe-Seyler **118**, 138, 1921.

[6]) Journ. of biol. Chem. **44**, 55, 1920.

[7]) Ebendaselbst **58**, 13, 1922.

[8]) Ebendaselbst **61**, 163, 1924.

[9]) Ebendaselbst **50**, 329, 1922.

[10]) Diese Zeitschr. **149**, 426, 1924.

[11]) Ebendaselbst **99**, 19ff., 1919.

dem Grunde in erster Linie in Betracht kam, da sie mit Ausnahme der von *Terada* angegebenen Methodik die einzige ist, bei welcher die Phosphorsäure zunächst als Strychninmolybdat gefällt und die Kolorimetrie erst mit dem Niederschlag durchgeführt wird. Die Genauigkeit der Methodik, mit der zugefügtes Phosphat gefunden wird, betrug in unseren Händen bei den kleinsten Mengen, die wir in Anwendung brachten (1 ccm der sechsfach verdünnten Stammlösung, entsprechend rund 0,01 mg Phosphor), im Maximum ± 3 Proz. Weniger günstige Erfahrungen machten wir mit der Bestimmung nach *Terada*. Hier ist der rote Farbton weitaus schwieriger zu vergleichen, außerdem halten wir die vorgeschriebene hohe Standardeinstellung und die durch das Phenylhydrazin bewirkte Interferenz der Färbung, die sich allerdings durch Reinigung des Phenylhydrazins bis zu einem gewissen Grade vermeiden läßt, für nicht unbedenklich.

Als Kolorimeter verwendeten wir anfangs ein *Krüss*sches Modell des *Dubosq* mit *Lummer-Brodhun*schem Würfel, später das *Klett*sche Biokolorimeter, das seiner Handlichkeit und exakt gearbeiteten Optik wegen für biochemische Zwecke ganz hervorragend geeignet ist. Sämtliche Untersuchungen wurden, um gleichmäßige Resultate zu erzielen, ständig in der Dunkelkammer bei der gleichen künstlichen Lichtquelle abgelesen. Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt, die Resultate aus dem Mittel von durchschnittlich 12 Ablesungen berechnet.

Die Untersuchung am Venenblut oder am Serum mußten wir mit Rücksicht auf die wiederholt vorzunehmenden Blutentnahmen von vornherein ausschalten. Praktisch kam nur die Untersuchung des Kapillarbluts in Frage, da die Häufung von Venaepunktionen in kurzen Zeiträumen bei ein und derselben Versuchsperson eine zu starke Zumutung darstellt. Im Gegensatz zu der von *Folin* und *Berglund*[1]) geäußerten Ansicht, daß Blutentnahme aus der Fingerbeere einen subjektiv weit unangenehmeren Eingriff als die Venaepunktion darstellt, möchten wir betonen, daß wir bei Venaepunktionen wiederholt bei empfindlichen Personen Schwächeanfälle erlebt haben, Zufälle, die bei der Entnahme aus der Fingerbeere nie zu beobachten waren. Die Untersuchung des Venenbluts und des Serums schied auch wegen der nicht unbeträchtlichen Blutmengen aus, die dabei der Versuchsperson während einer Serienuntersuchung entzogen werden müßten.

Die Blutentnahme wurde durchweg nach heißem Handbad mittels der von *Buercker* modifizierten *Franke*schen Nadel gemacht. Es gelingt so bei einiger Übung mit Leichtigkeit, ohne Pressen bis zu 6 ccm Blut, das nach dem heißen Handbad hellrot arteriell gefärbt abtropft, zu gewinnen. Wir haben für unsere Zwecke in der Regel 35 bis 40 Tropfen in einem mit einer Spur Kaliumoxalat bestreuten Schälchen aufgefangen. Bei günstigen Verhältnissen ist diese Menge in weniger als einer Minute zu gewinnen. Zur Phosphorsäurebestimmung verwendeten wir 1 ccm dieses arteriellen Kapillarbluts, das mit geeichter Vollpipette in 3 ccm destillierten Wassers hämolysiert und sofort mit 2 ccm 20proz. Trichloressigsäure enteiweißt wurde. Ein Herabgehen unter diese Säuremenge auf die Hälfte erwies sich nicht als vorteilhaft.

Im Gegensatz zu *Tisdall* wurde durch kleine Faltenfilterchen aus aschefreiem Filtrierpapier filtriert und von dem Filtrat je 1 ccm weiterverarbeitet.

---

[1]) Journ. of biol. Chem. 51, 213, 1922.

Zur Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure wurde 1 ccm des Filtrats in graduierten Zentrifugengläschen auf 6 ccm mit einer 10proz. Ammonsulfatlösung, die wiederholt auf Phosphorsäurefreiheit geprüft wurde, versetzt und nach *Tisdall* mit 2 ccm des Strychninmolybdänsäurereagens gefällt. Die Verwendung des Ammonsulfats an Stelle des destillierten Wassers hatte sich bei unseren Vorversuchen an reinen Phosphatlösungen als notwendig herausgestellt, da sonst bei den minimalen Phosphorsäuremengen der Strychninmolybdatniederschlag nur unvollkommen ausfällt.

Da wir nur den fünften Teil der von *Tisdall* vorgesehenen Menge Filtrat verarbeiteten, wurden auch bei der Weiterverarbeitung die notwendige Menge 1proz. NaOH zur Lösung des Niederschlags und die Zusätze von Wasser, Ferrocyanid und HCl entsprechend abgestuft. Um Verluste beim Überspülen auf ein Minimum zu reduzieren, haben wir die Farbentwicklung in den Zentrifugengläschen vor sich gehen lassen und erst nach erreichtem Maximum der Färbung in Meßkölbchen zu 20 ccm unter wiederholtem Nachspülen übergeführt und zur Marke aufgefüllt.

Zur Bestimmung des gesamtsäurelöslichen Phosphors wurde je 1 ccm des Filtrats in Jenenser Hartglaskölbchen oder Kölbchen aus Pyrexglas mit 0,3 ccm des *Neumann*schen Veraschungsgemisches — unter Verwendung von kleinen Glasperlen gegen Siedeverzug — verascht. Die Verwendung gewöhnlicher Siedesteine empfiehlt sich nicht. Die Veraschung wurde bis zum Verschwinden der nitrosen Dämpfe fortgeführt; die erkaltete Aschenlösung mit 1 bis 2 ccm Wasser verdünnt, mit einem Tröpfchen ganz verdünnter Lackmuslösung versetzt, mit konzentriertem NH_3 bis zur eben eintretenden Blaufärbung überneutralisiert und mit reiner HNO_3, 2:1 eben wieder sauer gemacht. Sodann wurde in die Zentrifugengläschen übergeführt, dreimal mit je 1 ccm destilliertem Wasser nachgespült und auf 6 ccm aufgefüllt. Die Weiterverarbeitung erfolgte entsprechend den *Tisdall*schen Vorschriften.

Wir haben anfangs in Anlehnung an die *Neumann*sche Vorschrift die Nitrosylschwefelsäure durch Kochen zerlegt, konnten uns aber durch darauf gerichtete Versuche davon überzeugen, daß dieses Verkochen überflüssig ist. Die Neutralisation erwies sich als unerläßlich, da bei zu starker Acidität die Fällung des Strychninphosphormolybdats gehemmt wird[1]).

Zur Neutralisation verwendeten wir anfangs reine *Merck*sche NaOH e natrio, die sich bei wiederholten Nachprüfungen als phosphorfrei erwies. Da ein später in Verwendung genommenes NaOH purissimum *Kahlbaum* geringe Mengen Phosphorsäure enthielt, sind wir zur Verwendung von konzentriertem NH_3 übergegangen, wodurch wir überdies die gleichen Bedingungen wie bei der Verarbeitung des anorganischen Phosphors erhielten.

Bevor wir auf die Ergebnisse unserer so gewählten Methodik eingehen, sind noch einige Punkte unserer Technik einer Kritik und Besprechung zu unterziehen. Zunächst war die Frage zu untersuchen, ob der Zusatz von Oxalat für die Bestimmung der Phosphorsäure gleichgültig ist oder nicht.

Wir konnten feststellen, daß die zur Hemmung der Gerinnung zugesetzten geringen Mengen von Oxalat die Ermittlung der Phosphorsäure im Blute bei sofortiger Verarbeitung weder bezüglich ihrer Gesamtmenge

[1]) Bei Durchsicht der Literatur nach Abschluß unserer Arbeit finden wir auch bei *Kleinmann* (diese Zeitschr. **99**, 166ff., 1919) Angaben über die unvollständige Ausfällung des Strychninphosphormolybdats bei zu hohen Säurekonzentrationen.

noch ihrer Verteilung beeinträchtigen. So ergab die Bestimmung des anorganischen Phosphors bei in Paraffinschale aufgefangenem Blute 3,51 mg-Proz., in dem in üblicher Weise mit Oxalat behandelten Blute 3,52 mg-Proz.

Eine andere Frage war die, ob nicht die der Enteiweißung vorausgehende Hämolyse die Verteilung der einzelnen Phosphorfraktionen beeinflussen könne. Wir waren um so mehr genötigt, zu dieser Frage Stellung zu nehmen, als sich in der Literatur eine Reihe von Angaben finden, welche die Abspaltung freier Phosphorsäure aus gebundener während der Hämolyse betonen. Es sei hier an die Angaben von *Lawaczeck*[1]) und *György*[2]), sowie an die Kontroverse zwischen *Buell*[3]) und *Briggs*[4]) erinnert. Zunächst stellen wir fest, daß bei sofortiger Enteiweißung, wie wir sie ausführten, die Hämolyse ohne jeglichen Einfluß auf Verteilung der Phosphorsäurefraktionen ist. Als Beispiel führen wir folgende Werte an:

	Ohne Hämolyse enteiweißt	Nach Hämolyse enteiweißt
I. Anorganischer Phosphor	2,95 mg-Proz.	2,97 mg-Proz.
Gasamtsäurelöslicher Phosphor .	30,00 „	30,00 „
II. Anorganischer Phosphor	3,72 „	3,70 „
Gesamtsäurelöslicher Phosphor .	28,00 „	28,00 „

Bleibt allerdings das hämolysierte Blut längere Zeit bei Zimmertemperatur stehen, so finden wir analog den Angaben von *Lawaczeck* und *György* eine beträchtliche Zunahme des anorganischen Phosphors auf Kosten des organisch gebundenen. Bereits ein Stehen von 20 Minuten bei Zimmertemperatur ergibt beträchtliche Vermehrung des anorganischen Phosphors, z. B. von 2,9 auf 3,2 mg-Proz., von 3,7 auf 4,0 mg-Proz. Bei längerer Dauer der Hämolyse nehmen diese Werte entsprechend zu. Doch wollen wir mit Rücksicht auf Raumersparnis auf Wiedergabe dieser Werte, die nur eine Bestätigung bereits vorliegender Angaben bilden, verzichten. Bei Eisschranktemperatur ist der Einfluß der Hämolyse weniger deutlich, doch läßt sich auch hier nach zwei- bis dreistündigem Stehen eine deutliche Zunahme der anorganischen Phosphorsäure feststellen.

Über den Einfluß der Enteiweißungsmethode auf die Phosphorsäurewerte siehe unten.

III. Die Werte des anorganischen und des gesamtsäurelöslichen Phosphors im arteriellen Kapillarblut und die Verteilung auf Körperchen und Plasma bzw. Serum.

Phosphorbestimmungen im menschlichen Blute wurden bisher fast ausschließlich im Serum bzw. Oxalatplasma ausgeführt. Werte für das venöse Vollblut finden sich in der amerikanischen Literatur ganz vereinzelt. Die ältesten Angaben rühren von *Bloor*[5]) her, der nach seiner nephelo-

[1]) Diese Zeitschr. **145**, 351, 1924.
[2]) Ebendaselbst **161**, 157, 1925.
[3]) Journ. of biol. Chem. **56**, 97, 1923.
[4]) Ebendaselbst **59**, 255, 1924.
[5]) Journ. of biol. Chem. **36**, 49, 1918.

metrischen Methodik in sechs Fällen die Werte für Plasma und Körperchen getrennt bestimmte. Seine Werte für das Plasma auf P umgerechnet, liegen zwischen 1,9 und 4,36 mg-Proz. für den anorganischen P, für den gesamtsäurelöslichen P des Plasmas zwischen 2,37 und 4,52 mg-Proz., die Werte für die Blutkörperchen liegen zwischen 3,1 und 8,62 mg-Proz. bzw. 44,3 und 79,1 mg-Proz. Von *Buell* werden für das Gesamtblut angegeben, auf P umgerechnet, Werte zwischen 1,9 und 2,15 mg-Proz., für das Plasma — defibriniert bzw. Oxalatplasma — 2,97 bzw. 3,1 mg-Proz. Die nach Hämolyse der gewaschenen Blutkörperchen gefundenen Zahlen bewegen sich zwischen 0,82 und 1,04 mg-Proz.

Tabelle I.

Nr.	Name und Datum	Phosphorwerte mg-Proz.		Nr.	Name und Datum	Phosphorwerte mg-Proz.	
		anorg.	gesamtsäurelöslich			anorg.	gesamtsäurelöslich
1	*Pop.* 22. X.	3,87	27,3	20	*Fr.* 1. XII.	3,95	28,6
2	*Pop.* 29. X.	4,72	25,3	21	*Fr.* 18. I.	4,03	30,0
3	*Pop.* 5. XI.	3,87	32,6	22	*Fr.* 2. II.	4,73	22,4
4	*Pop.* 30. XI.	4,44	33,3	23	*Alb.* 28. I.	4,56	27,3
5	*Pop.* 4. II.	4,30	28,6	24	*Alb.* 11. II.	4,82	27,6
6	*Pop.* 8. VI.	3,36	33,4	25	*Ros.* 3. XI.	4,11	24,5
7	*Dol.* 27. X.	4,62	26,5	26	*Leip.* 26. XI.	4,32	30,2
8	*Dol.* 19. XI.	3,59	30,4	27	*Eis.* 21. XII.	3,66	30,9
9	*Dol.* 8. XII.	4,58	33,2	28	*Haus.* 29. I.	3,77	28,5
10	*Dol.* 14. I.	4,78	28,6	29	*Jaek.* 30. I.	3,93	28,7
11	*Dol.* 10. VI.	4,03	26,8	30	*Schm.* 3. XII.	4,50	30,3
12	*Bar.* 23. XI.	3,41	33,3	31	*Er.* 22. II.	5,01	25,2
13	*Bar.* 10. XII.	5,00	30,6	32	*Spin.* 27. II.	2,66	23,3
14	*Bar.* 3. II.	4,36	30,5	33	*St.* 4. III.	2,91	25,5
15	*Bar.* 9. II.	3,53	32,9	34	*Just.* 9. III.	3,02	24,5
16	*Ber.* 24. XI.	3,87	23,8	35	*Schil.* 18. III.	3,20	23,0
17	*Ber.* 15. XII.	3,53	27,3	36	*Wa.* 29. IV.	4,21	27,3
18	*Ber.* 30. I.	4,49	28,1	37	*Salt.* 4. V.	3,54	32,6
19	*Ber.* 28. V.	2,67	25,3	38	*Fisch.* 21. V.	2,91	26,3

38 Fälle: Mittelwert für anorganischen P . . . . . 3,91 mg-Proz.
„ „ gesamtsäurelöslichen P . 28,3 „

In der deutschen Literatur findet sich nur in der Arbeit von *Lawaczeck*[1]) ein größeres Material von Zahlen, das an venösem Blut nach der *Embden*schen Methode gewonnen wurde und hauptsächlich den anorganischen P berücksichtigt. Die von ihm angegebenen Werte für den anorganischen P betragen zwischen 2,47 und 5,74 mg-Proz., für den gesamtsäurelöslichen zwischen 20 und 29,5 mg-Proz.[2]). Aus unserem Material, das weit über 100 Einzeluntersuchungen an mehr als 40 stoffwechselgesunden Studenten und Ärzten des Instituts umfaßt, bringen wir in vorstehender Tabelle eine Auswahl von nüchtern untersuchten Fällen, die zum Teil mehrmals in Zeitabschnitten von Wochen bis Monaten untersucht wurden. Von einer Wiedergabe der anderen Zahlen sehen wir ab, da nach unseren Erfahrungen nur die Nüchternwerte Anspruch erheben können, als Basis für Normalwerte betrachtet zu werden.

Aus unseren Zahlen ergibt sich ein Minimalwert von 2,66 für den anorganischen P, ein Maximalwert von 5,01 mg-Proz. Die für den gesamtsäurelöslichen P gefundenen Zahlen liegen zwischen 22,4 und 33,3 mg-Proz. Als Mittelwert errechnet sich für den anorganischen P 3,91, für den gesamtsäurelöslichen 28,3 mg-Proz. Die Zahlen stimmen mit den von *Lawaczeck* angegebenen weitgehend überein. Die etwas höheren Werte für den anorganischen P, die er anführt, dürften nach unserer Erfahrung teils auf die vorangegangene Nahrungszufuhr, teils auf die angewandte Enteiweißungsmethode (siehe unten) zurückzuführen sein. Eine Konstanz der Werte für das Einzelindividuum für verschiedene Zeiten läßt sich nicht feststellen (siehe Tabelle I, wo die Nüchternwerte der mehrmals untersuchten Versuchsperson untereinander zusammengestellt sind, Fall 1 bis 6). In einer weiteren Reihe von Untersuchungen beschäftigten wir uns mit der Verteilung der einzelnen Phosphorfraktionen auf Körperchen und Plasma bzw. Serum. Hier sind die Angaben der Literatur als durchaus kontrovers zu bezeichnen. Während *Zucker* und *Gutman*[3]) nach ihren Untersuchungen eine gleichmäßige Verteilung des Phosphations zwischen Körperchen und Plasma feststellen, wird von *Buell* das Vorkommen anorganischer Phosphorsäure in den Erythrocyten bzw. organisch gebundener im Plasma als post mortem-Erscheinung gedeutet. In unseren eigenen Untersuchungen, die an über 20 Fällen ausgeführt wurden, verwendeten wir ausschließlich Nativplasma, das nach der von *Starlinger*[4]) durchgearbeiteten Methodik — Auffangen des Blutes in paraffinierten Röhrchen, sofortiges Zentrifugieren bei großer Tourenzahl, Abhebern des abgeschiedenen Plasmas — gewonnen wurde. Das Serum wurde spätestens 2 Stunden nach der Blutentnahme verarbeitet. Zur Verwendung kam Venenblut, das durch Punktion aus der kaum gestauten Vena mediana entnommen wurde. Die Entnahmen erfolgten durchweg 3 bis 4 Stunden nach dem ersten Frühstück. Ein Teil unserer Zahlen sind in Tabelle II niedergelegt.

Von den hier angeführten 15 Fällen ist in 13 der Vergleich zwischen Vollblut und Plasma durchgeführt (siehe Tabelle II, Fall 3 bis 15). Durch-

---

[1]) Diese Zeitschr. **145**, 351, 1924.

[2]) Die Werte sind der Einheitlichkeit wegen auf P umgerechnet.

[3]) Proc. soc. exper. Biol. a. Med. **19**, 169, 1921/22.

[4]) Herrn Dr. *Starlinger* sowie Herrn Dr. *Hartl* sind wir für die liebenswürdige Unterstützung, die sie uns bei den ersten Versuchen dieser Reihe zuteil werden ließen, sowie für die Ausführung der Hämatokritbestimmungen zu Dank verpflichtet.

Tabelle II.

Nr.	Name	Vollblut		Plasma		Serum		Bemerkungen
		anorg. P	gesamtsäurelöslich. P	anorg. P	gesamtsäurelöslich. P	anorg. P	gesamtsäurelöslich. P	
1		3,55	30,0	—	—	4,57	5,03	
2	*J.*	2,28	24,8	—	—	3,08	3,39	
3		3,87	30,0	4,64	—	—	—	Hämatokritwerte Körperchen : Plasma = 48 : 52
4		3,16	28,3	3,26	—	3,16	—	Hämatokritwerte Körperchen : Plasma = 42 : 58
5		4,08	34,5	4,76	—	—	—	
6	*Popp.*	3,75	25,2	4,65	5,00	4,11	5,45	Hämatokritwerte Körperchen : Plasma = 50 : 50
7		3,51	23,4	4,23	4,28	3,31	—	Hämatokritwerte Körperchen : Plasma = 48 : 52 Diabetes mellitus
8	*Dol.*	3,34	25,8	3,56	—	3,97	4,43	
9	*Bar.*	3,84	35,9	4,19	—	4,36	—	
10		2,20	27,7	2,82	—	2,64	2,99	
11	*Taub.*	2,32	22,2	3,11	3,78	4,05	4,22	
12	*Berg.*	2,17	23,2	2,43	2,58	2,83	2,85	
13	*Hein.*	2,04	23,0	2,56	3,47	3,20	—	
14	*Dol.*	3,45	29,0	3,67	3,95	3,92	3,95	
15	*Bricht.*	3,36	30,9	4,32	4,57	3,91	4,43	

gehend ergibt sich, von Fall 4 abgesehen, wo die Differenz noch innerhalb der Fehlergrenzen liegen kann, daß der Wert für das Vollblut niedriger liegt als für das Plasma. Rechnen wir den Durchschnitt, so ergibt sich für das Vollblut ein Wert von 3,16, für das Plasma von 3,70 mg-Proz. Die Differenzen schwanken zwischen 0,22 und 0,96 mg-Proz., im Durchschnitt 0,54. Unter Zugrundelegung der Werte für das Vollblut beträgt die maximale Differenz in Prozenten 34 (Fall 11), die minimale 6 Proz. (Fall 14). In sieben Fällen, in denen auch der gesamtsäurelösliche Phosphor des Plasmas bestimmt wurde, finden wir durchweg Differenzen, die zwischen 0,15 und 0,91 mg-Proz. schwanken. Nur in Fall 5, dem einzigen Diabetiker, den wir zu untersuchen Gelegenheit hatten, liegt die Differenz innerhalb der Fehlergrenze. Sehen wir von diesem Falle ab, so beträgt die Differenz im Durchschnitt 0,43 mg-Proz., ein Wert, der mit dem von *Bloor* angegebenen weitgehende Übereinstimmung zeigt. Die von ihm in sechs Fällen am Oxalatplasma festgestellten Differenzen bewegen sich zwischen 0,16 und 0,70 mg-Proz., im Durchschnitt 0,45. Wie beim Vollblut, scheint auch beim Plasma der Oxalatzusatz die Verteilung des Phosphors nicht zu beeinflussen. Beim Vergleich zwischen Vollblut und Serum liegen die Verhältnisse ähnlich (siehe Tabelle II, Fall 1, 2, 4, 6 bis 15). Von den 13 Fällen ist der Gehalt des Serums an P in 11 höher als der im Vollblut, nur in zwei Fällen (Fall 2 und 5) ist der Phosphorwert des Serums dem im Vollblut gleich bzw. innerhalb der Fehlergrenzen etwas niedriger. In neun Fällen wurde auch der Wert für den gesamtsäurelöslichen P im Serum bestimmt. Zweimal (Fall 12 und 14) fällt die Differenz in die Fehlergrenze, in den restlichen Fällen ergeben sich Abweichungen zwischen 0,17 und 1,34 mg-Proz., im Durchschnitt liegt der Wert um 0,51 mg-Proz. höher als der beim anorganischen P ermittelte. Den Vergleich des anorganischen P im Vollblut, Serum und Plasma haben wir in elf Fällen durchgeführt (Fall 4, 6, 7 bis 15).

In einem einzigen Falle (Fall 4) wurden sämtliche Werte gleich gefunden. Viermal liegt der Plasmawert höher als der Serumwert (Fall 6, 7, 10 und 15), sechsmal (Fall 8, 9, 11 bis 14) findet sich das umgekehrte Verhältnis. Von Fall 4 und 7 abgesehen, ist der Wert für das Vollblut durchweg am niedrigsten. Bei dem in fünf Fällen durchgeführten Vergleich zwischen gesamtsäurelöslichem P im Serum und Plasma ergibt sich der Serumwert dreimal höher als der Wert für das Plasma, in zwei Fällen sind die Werte gleich bzw. liegt die Differenz innerhalb der Fehlergrenze.

Besonderes Interesse beansprucht die Verteilung des anorganischen Phosphors auf Plasma und Körperchen. Für vier Fälle (Fall 3, 4, 6, 7) haben wir die Verteilung aus den Hämatokritwerten errechnet. Danach entfallen für

Fall 3	vom	anorg.	P	des	Vollbluts	=	3,87	auf	Körperchen	1,46	in Proz.	35,4
„ 4	„	„	P	„	„	=	3,16	„	„	1,27	„ „	40,2
„ 6	„	„	P	„	„	=	3,75	„	„	1,38	„ „	36,8
„ 7	„	„	P	„	„	=	3,51	„	„	1,30	„ „	37,3

Die Schwankungen innerhalb dieser Werte sind auffallend gering; da wir an Nativplasma gearbeitet haben und die Verarbeitung raschestens durchgeführt wurde, scheint uns ein Übertritt von Phosphat aus dem Plasma in die Körperchen unwahrscheinlich und wir möchten annehmen, daß unsere Zahlen den tatsächlichen Verhältnissen in der Verteilung des anorganischen Phosphats auf Plasma und Körperchen entsprechen. Macht so der anorganische P in den Erythrocyten rund 37,4 Proz. des anorganischen P im Vollblut aus, so liegen die Verhältnisse für den organisch gebundenen durchweg anders. Fast der gesamte organisch gebundene, säurelösliche P ist in den Körperchen enthalten, in Fall 6 würden auf die Körperchen 21,28, auf das Plasma 0,17 mg-Proz., also nur 0,8 Proz. des organisch gebundenen P entfallen. Im Fall 7 läßt sich im Plasma überhaupt kein organisch gebundener P nachweisen. In methodischer Hinsicht lehren die Zahlen der Tabelle noch die Überlegenheit der Bestimmung der Phosphorsäure im Vollblut gegenüber der Untersuchung des Serums. Das wechselnde Verhalten der Serum- und Plasmawerte deutet darauf hin, daß während der Gerinnung teils Aufnahme, teils Abgabe von anorganischem Phosphat durch die Erythrocyten erfolgt. Die in der Mehrzahl der Fälle höheren Werte des gesamtsäurelöslichen P im Serum gegenüber den analogen Plasmawerten sprechen überdies für einen Übertritt organisch gebundener Phosphorsäure ins Serum. Daß längeres Stehen des Serums in Kontakt mit dem Blutkuchen zu hohe Phosphorsäurewerte liefert, wird auch von *Tolstoi*[1]) betont, der bei seinen vergleichenden Untersuchungen an Oxalatplasma und Serum die Werte für den organisch gebundenen P bald gleich, bald niedriger oder höher fand.

Für die Bestimmung des gesamtsäurelöslichen P kommt unseres Erachtens ausschließlich das Vollblut in Betracht. Auf die Bedeutung der Erythrocyten für den intermediären Phosphatstoffwechsel ist bereits von *Lawaczeck* und *György* hinreichend hingewiesen worden. Auch unsere Befunde, soweit sie die Verteilung betreffen, und die Ergebnisse unserer nachfolgenden Untersuchungen sprechen für eine hervorragende Rolle, welche den Erythrocyten zumindest beim Transport, vielleicht auch im Auf- und Abbau organischer Phosphorsäureverbindungen zufällt.

[1]) Journ. of biol. Chem. 55, 157, 1923.

Bei der Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure im Vollblut dürfen wir jedoch nicht eine oft sich unangenehm bemerkbar machende Abspaltung anorganischer Phosphorsäure aus organischen Komplexen vernachlässigen. Diese leicht abspaltbare Phosphorsäure erwähnt bereits *Bloor*, und wir möchten die auffallend hohen Werte, die von ihm für den anorganischen P der Körperchen angegeben werden, auf eine solche Abspaltung zurückführen. Auch *Greenwald*[1]) weist auf das Vorkommen dieser durch Säure leicht abspaltbaren Form hin. Wir machten diese Erfahrung zu Beginn unserer Untersuchung, als wir die von *Embden* und seiner Schule bevorzugte Enteiweißung nach *Schenck* mit der Enteiweißung durch Trichloressigsäure verglichen. Wir erhielten hier in einigen Fällen tadellose Übereinstimmung, während dazwischen wieder beträchtliche Differenzen auftraten. Die Werte nach der *Schenck*schen Enteiweißung lagen anfangs durchweg höher. Um zu entscheiden, ob hier nicht eventuell eine Absorption von Phosphorsäure durch den Trichloressigsäureniederschlag vorliege, haben wir an einem größeren Material die Werte des anorganischen Phosphors nach beiden Enteiweißungsmethoden verglichen und gleichzeitig auch den gesamtsäurelöslichen P bestimmt. Während wir für den gesamtsäurelöslichen P einwandfreie Übereinstimmung erhielten, ergab sich in einer ganzen Reihe von Fällen eine wesentliche Differenz im anorganischen P, die teils zugunsten der *Schenck*schen, teils zugunsten der Trichloressigsäureenteiweißung ausfiel. Durchschnittlich waren die Werte nach *Schenck* höher als die nach Trichloressigsäure erhaltenen. Wir begnügen uns mit der Wiedergabe der Extremfälle. In 29 Fällen wurde sechsmal volle Übereinstimmung erzielt. Der nach *Schenck* gefundene Wert war in 16 Fällen höher als der nach Trichloressigsäure gefundene, und zwar lag im extremsten Falle der Wert um 97 Proz. höher als der mit Trichloressigsäure ermittelte. In sieben Fällen war der nach Trichloressigsäure festgestellte Wert höher, und zwar maximal um 30 Proz. Die Ausschläge betrugen bei den Fällen, in welchen die Verarbeitung nach *Schenck* höhere Werte ergab, im Mittel 38 Proz. Dort, wo umgekehrt die Trichloressigsäureenteiweißung den höheren Wert lieferte, ergab sich ein Durchschnitt von rund 17 Proz. Die Ergebnisse veranlaßten uns, die Enteiweißung durch Trichloressigsäure beizubehalten. Eine nachträgliche Abspaltung von Phosphorsäure im Filtrat konnten wir bei keiner der Enteiweißungsmethoden feststellen. Diese Erfahrungen lassen es auch verstehen, weshalb *Benedict* nach seiner direkten Methodik im Serum keinen organisch gebundenen P nachweisen konnte, da bei dem von ihm vorgeschriebenen Erhitzen mit Säure die Abspaltung erfolgen muß. Diese Überlegung war für uns der Grund, warum wir die sonst einfacheren direkten Methoden nicht in Anwendung brachten. Daß diese leicht abspaltbaren Formen der Phosphorsäure mit gewissen Phasen des Kohlehydratstoffwechsels in Zusammenhang stehen, scheint uns auf Grund von Befunden, auf die wir in der folgenden Mitteilung zurückkommen werden, sehr wahrscheinlich.

Zusammenfassung.

1. Die Bestimmung des anorganischen und des gesamtsäurelöslichen P nach der *Tisdall*schen Methodik, die auf kleinste Blutmengen zweckmäßig angewendet wurde, ergibt als Durchschnittswert bei 20 nüchtern

[1]) Journ. of biol. Chem. **63**, 339 bis 349, 1925.

untersuchten Gesunden für den anorganischen 3,91 mg-Proz., für den gesamtsäurelöslichen P 28,3 mg-Proz. Eine Konstanz der Phosphorwerte für das einzelne Individuum für verschiedene Zeiten besteht nicht.

2. Vergleichende Untersuchungen am Vollblut, Nativplasma und Serum ergaben für das Vollblut durchschnittlich die niedrigsten Werte, die für das Serum erhaltenen Zahlen lagen in der Mehrzahl der Fälle höher als die des Plasmas. Der Gehalt des Plasmas und Serums an organisch gebundenem, säurelöslichem P ist in einzelnen Fällen gleich Null. In vier Fällen wurde aus den Hämatokritwerten die Verteilung der Phosphorsäurefraktionen auf Erythrocyten und Plasma bestimmt. Nach den weitgehend übereinstimmenden Zahlen sind von der anorganischen Phosphorsäure rund 37,4 Proz. in den Körperchen, 62,6 Proz. im Plasma enthalten. Die organische säurelösliche Fraktion ist so gut wie ausschließlich in den Körperchen enthalten. Den Erythrocyten dürfte zumindest beim Transport, eventuell auch beim Auf- und Abbau organischer Phosphorverbindungen eine hervorragende Bedeutung zukommen.

3. Vergleichende Untersuchungen mit der Enteiweißung nach *Schenck* und Trichloressigsäure ergaben Anhaltspunkte für das Vorhandensein einer äußerst labilen, bereits durch die Säurewirkung des Enteiweißungsmittels spaltbaren, organischen Phosphorsäureverbindung.

Beiträge zum Problem des Blutzuckers.

IV. Mitteilung:
Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 2. Glucose.

Von

H. K. Barrenscheen, Friedrich Doleschall und **Ludwig Popper.**

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 23. Juli 1926.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

I.

Die Umwälzung, welche das Insulin im Zuckerstoffwechsel des Diabetikers hervorruft, hat frühzeitig das Augenmerk auf das Verhalten auch der verschiedenen anorganischen Bestandteile des Blutes gelenkt. Die Bedeutung, welche man seit den Arbeiten von *Embden*, *Hill* und *Meyerhof* dem Phosphation im intermediären Kohlehydratstoffwechsel zuschreibt, war zunächst auch von rein theoretischem Standpunkt aus Veranlassung, das Verhalten der Phosphorsäure im Blut nach Insulin zu untersuchen. Eine solche Untersuchung lag um so mehr auf der Hand, als unsere theoretische Vorstellung der Phosphorylierung eine erhebliche Rolle im Auf- und Abbau der Kohlehydrate zuweist. Die erste Arbeit, welche sich ausführlicher mit dieser Frage beschäftigt, ist die von *Harrop* und *Benedict*[1]), welche außer der Beeinflussung der Phosphorsäure im Serum durch Insulin auch die Phosphorsäureausscheidung durch den Harn berücksichtigt.

Ausgehend von der Erwägung, daß die Tätigkeit des Inselapparats durch Zufuhr von Kohlehydrat angeregt werde, untersuchten sie in drei Fällen auch den Einfluß der Zuckerzufuhr auf die anorganische Phosphorsäure im Serum und fanden durchweg einen Abfall der Phosphorsäurekurve, der jenseits des höchsten Punktes der Blutzuckerkurve sein Minimum erreicht. Den Einfluß des Insulins auf die Phosphorsäure bestätigten *Staub*, *Günther* und *Fröhlich*[2]) an je einem Versuch am normalen Hunde und komatösem Diabetiker. Zu wesentlich gleichen Ergebnissen wie *Harrop*

[1]) Journ. of biol. Chem. **59**, 683, 1924; Proc. soc. exper. Biol. and Med. **20**, 538, 1923.

[2]) Klin. Wochenschr. Jahrg. 2, 1923, S. 2337.

und *Benedict* gelangen auch *Blatherwick, Bell* und *Hill*[1]) in ihren Versuchen bei gleichzeitiger Insulin- und Glucosegabe. Für das Kaninchen hatte übrigens *Wigglesworth, Woodrow, Winter* und *Smith*[2]) einen Abfall des anorganischen Phosphors im Serum festgestellt, für den Hund hatte *Salvesen*[3]) ein Absinken des anorganischen Phosphats nach Glucosezufuhr nachgewiesen. Auch die Arbeit von *Bolliger* und *Hartman*[4]), welche an Hunden und in vereinzelten Versuchen am Menschen nach intravenöser Glucosezufuhr untersuchten, bringt eine Bestätigung von *Harrop* und *Benedict*.

Wir haben diese Frage einer erneuten Bearbeitung auf breiterer experimenteller Basis unterzogen, weil wir für den Mechanismus der Blutzuckerkurve und die Frage des intermediären Kohlehydratstoffwechsels weitere Aufklärung erhofften.

II. Versuchsanordnung.

Die Untersuchungen wurden mit der in der vorangehenden Arbeit angegebenen Technik am arteriellen Kapillarblut zum großen Teile in Selbstversuchen durchgeführt. Die übrigen Versuchspersonen waren — mit Ausnahme von einzelnen stoffwechselgesunden Patienten der ersten Hautklinik[5]) — durchweg gesunde und kräftige Ärzte und Studenten des Laboratoriums im Alter von 21 bis 38 Jahren. Die Blutzuckerbestimmungen wurden nach der Methodik von *Hagedorn* und *Jensen*[6]) ausgeführt. Die Aufarbeitung des Versuchsmaterials erfolgte sofort. Die Glucosegaben haben wir der Gleichförmigkeit der Versuchsbedingungen wegen bei peroraler Darreichung fast ausschließlich so bemessen, daß wir pro Kilogramm Körpergewicht 1 g Glucose verabreichten. Die Glucose (wasserfreier reiner Traubenzucker *Kahlbaum* bzw. *Schuchardt*) wurde unmittelbar nach Ermittlung des Nüchternwertes in etwa 250 ccm Tee verabreicht.

III. Perorale Glucosezufuhr.

Wir verwerten hier zehn Fälle, die sämtlich, mit Ausnahme von Versuch 7, 21 und 22 (s. Tabelle I) die ihrem Körpergewicht entprechende Menge Glucose erhielten. In weiteren zwei Versuchen wurde auch der Einfluß wiederholter Zuckergaben auf die Phosphorsäurekurve untersucht.

Gehen wir von dem in der zweiten Mitteilung dieser Reihe aufgestellten Prinzip der Einteilung der Blutzuckerkurve in zwei Typen aus, so stehen dem Assimilationstyp in seiner reinen Form zwei Fälle nahe (Versuch 3 und 28), den Resorptionstyp zeigen zwei Kurven (Versuch 8 und 38). Die übrigen sind Mischformen, die teils den protrahierten Abfall, teils eine ausgesprochene zweite Resorptionszacke zeigen. Auf eine weitere Analyse der Blutzuckerkurven wollen wir hier nicht eingehen, verweisen nur auf die in fast allen Fällen festzustellende Hypoglykämie. Betrachten wir zunächst das Verhalten des anorganischen Phosphors, so finden wir hier

[1]) Journ. of biol. Chem. **61**, 241, 1924.
[2]) Ebendaselbst **57**, 447, 1922/23.
[3]) Ebendaselbst **56**, 443, 1923.
[4]) Ebendaselbst **64**, 91, 1925.
[5]) Für die Überlassung dieser Fälle sind wir Herrn Dozent Dr. *Planner* zu Dank verpflichtet.
[6]) Diese Zeitschr. **135**, 54, 1923.

T

Nr.	Name und Datum	Blut	0	15	30	45	
3	*Pop.*	Zucker	127	149	175	182	
	29. X. 1925	Anorganischer Phosphor .	4,72	5,49	4,46	3,90	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	25,3	26,5	27,2	27,4	
28	*Bar.*	Zucker	99	155	174	166	
	9. II. 1926	Anorganischer Phosphor .	3,53	4,12	3,58 [1])	3,31	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	32,9	33,6	27,1 [5])	24,1	
8	*Ber.*	Zucker	96	103	118	113	
	24. XI. 1925	Anorganischer Phosphor .	3,87	4,25	3,53	3,58	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	23,8	24,6	25,6	25,9	
38	*Salt.*	Zucker	112	107	133	137	
	4. V. 1926	Anorganischer Phosphor .	3,54	3,98	3,23	3,47	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	32,1	31,7	32,6	34,5	
11	*Frei.*	Zucker	99	154	126	114	
	1. XII. 1925	Anorganischer Phosphor .	3,95	5,22	3,79	2,98	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	28,6	26,1	26,1	30,6	
21	*Alb.*	Zucker	101	159	160	154	
	28. I. 1926	Anorganischer Phosphor .	4,56	5,28	3,48	2,96	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	27,3	24,9	22,8	25,1	
9	*Leip.*	Zucker	102	156	151	135	
	26. XI. 1925	Anorganischer Phosphor .	4,32	6,45	4,35	3,64	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	30,2	31,0	27,8	26,2	
18	*Dol.*	Zucker	82	111	135	120	
	14. I. 1926	Anorganischer Phosphor .	4,78	5,45	3,79	3,77	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	28,6	25,9	28,6	23,1	
7	*Bar.*	Zucker	90	132	165	115	
	23. XI. 1925	Anorganischer Phosphor .	3,41	4,00	3,64	3,33	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	33,3	32,1	29,8	29,6	
22	*Haus.*	Zucker	106	139	186	167	
	29. I. 1926	Anorganischer Phosphor .	3,77	4,25	3,42	3,08	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	28,5	25,3	24,3	31,9	

Tabelle Ia. Versuch

Nr.	Name und Datum	Blut	0	15	30	
24	*J.*	Zucker	103	121	101	
	30. I. 1926	Anorganischer Phosphor .	3,93	3,02	3,37	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	28,7	24,8	30,0	

Nr.	Name und Datum	Blut	0	15	30	45	
27	*Pop.*	Zucker	99	124	141	147	
	4. II. 1926	Anorganischer Phosphor .	4,3	5,1	4,1	4,0	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	28,6	30,9	26,7	26,8	

	95	115	135	165	195	Bemerkungen
7	101	90	77	107	112	70 g Glucose
55	3,28	3,14	5,45	5,00	4,29	
	28,1	27,1	31,0	29,0	26,3	
	126	85	62	75	77	
53	2,88 [2])	2,79	2,69	2,86 [3])	3,25 [4])	80 g Glucose. [1]) *Schenck*-Wert 3,33. [2]) *Schenck*-Wert 3,96. [3]) *Schenck*-Wert 3,38. [4]) *Schenck*-Wert 4,09
	20,3 [5])	20,7	29,5	29,1 [5])	30,2 [5])	[5]) *Schenck*-Werte identisch
	114	94	112	97	70	70 g Glucose
5	3,55	2,98	3,16	3,76	3,78	
	27,8	25,4	25,7	26,9	25,7	
	125	—	118 [1])	117 [2])	—	[1]) Nach 125 Min. [2]) Nach 155 Min.
52	3,05	—	3,15	2,95	—	65 g Glucose
	30,2	—	30,0	27,4	—	
	129	116	86	81	86	60 g Glucose
58	2,84	3,03	3,94	3,46	3,58	
	23,1	23,4	28,8	25,2	24,0	
	93	120	125	83	88	100 g Glucose
7	2,85	2,92	2,85	3,21	—	
	23,1	23,6	26,3	23,2	—	
[1])	104 [1])	71 [2])	89 [3])	104 [3])	—	70 g Glucose. [1]) Entnahme 5 Min. verspätet. [2]) Entnahme 10 Min. verspätet. [3]) Entnahme 15 Min. verspätet
4	3,42	3,57	3,67	4,48	—	
	21,4	24,0	32,4	30,6	—	
3	104	—	73	79	84	65 g Glucose
5	3,53	4,25	4,62	5,22	4,88	
	26,1	32,2	37,5	32,6	30,0	
3	90	110	100	95	—	20 g Glucose
1	2,93	4,14	4,60	3,92	—	
	25,0	24,7	33,3	35,1	—	
3	117	126	113	83	93	100 g Glucose
1	2,99	3,32	3,39	—	3,35	
	29,1	30,0	28,0	—	25,5	

ıd **100 g** Glucose.

	80	100	110	140	155	175	205	Bemerkungen
	128	112	130	109	110	104	105	20 g Glucose, nach 65 Min.
0	**3,25**	3,03	3,33	3,53	2,83	3,35	3,13	100 g Glucose
	30,3	—	27,5	—	30,3	33,3	27,2	

	95	110	125	140	170	200	230	260	Bemerkungen
	182	164	144	129	121	81	63	67	20 g Glucose, nach 60 Min.
	3,4	3,2	2,8	2,8	2,6	3,2	3,4	3,5	100 g Glucose
	30,0	24,7	26,4	23,1	21,3	—	19,9	25,1	

regelmäßig bei unserer ersten Entnahme nach der Glucosezufuhr einen Anstieg, der absolut zwischen 0,28 und 2,13 mg-Proz., in Prozenten des Ausgangswertes 10 bis 49 Proz. beträgt und somit weit über der Fehlergrenze der Methodik liegt. Diesem initialen Anstieg folgt nun ein allmählicher Abfall, der entsprechend den Angaben der amerikanischen Autoren sein Minimum in allen Fällen beträchtlich nach dem höchsten Gipfel der Blutzuckerkurve erreicht. In der Mehrzahl der Fälle liegt dieses Minimum näher dem tiefsten Punkt der Blutzuckerkurve als ihrem Maximum (siehe Kurve 1 und 2). Der Ausgangswert wird in einigen Fällen innerhalb der

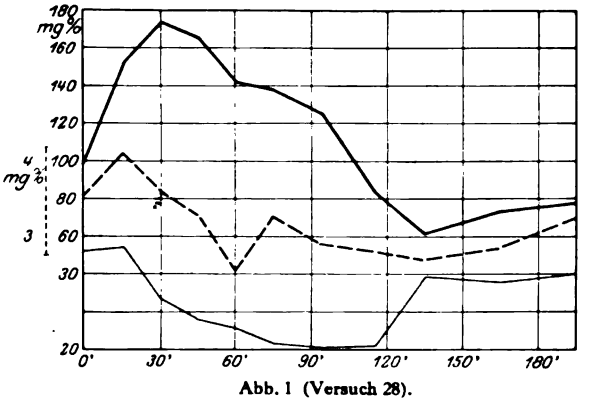


Abb. 1 (Versuch 28).

——— Blutzucker. ····· Anorg. P. ——— Gesamtsäurelösl. P.

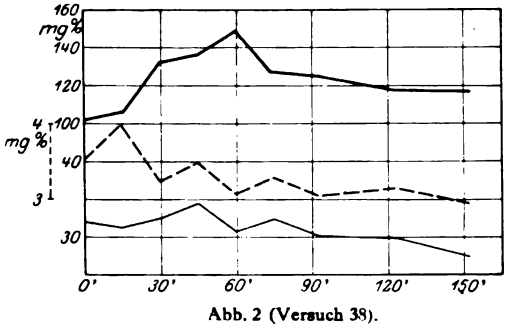


Abb. 2 (Versuch 38).

——— Blutzucker. ····· Anorg. P. ——— Gesamtsäurelösl. P.

von uns beobachteten Zeit wieder erreicht oder überschritten, in anderen Fällen bleibt die Kurve dauernd unterhalb des Ausgangspunktes. In einzelnen Kurven läßt sich deutlich eine Unterbrechung des Abfalls durch einen neuerlichen Anstieg feststellen. Ob wir es hier mit einem reellen Anstieg zu tun haben oder ob dieser Anstieg durch den in der vorigen Mitteilung erwähnten leicht abspaltbaren Phosphor bedingt ist, können wir mit Sicherheit nicht entscheiden. Auf Grund vergleichender Untersuchung zwischen der Enteiweißung mit Trichloressigsäure und nach *Schenck*, die wir in mehreren Fällen im Verlauf einer solchen Untersuchungs-

reihe vorgenommen haben, möchten wir der letztgenannten Meinung den Vorzug geben.

Die Kurve des gesamtsäurelöslichen Phosphors zeigt in ihrem Anfangsteil ein wechselndes Verhalten. In einzelnen Fällen finden wir einen Anstieg, der manchmal dem im anorganischen Phosphor zutage tretenden entspricht, in anderen Fällen wieder diesen beträchtlich übersteigt. Die Mehrzahl der Fälle zeigt einen Abfall, der aber bald durch einen neuerlichen Anstieg unterbrochen wird. Fast ausnahmslos finden wir einen Anstieg gegen Ende der Kurve, der zeitlich mit dem tiefsten Abfall der Blutzuckerkurve zusammenfällt und vielfach den Gipfelpunkt dieser Kurve bedeutet. Dieser terminale Anstieg scheint uns das einzig Typische in unseren Kurven vorzustellen, während sonst sich gerade hier beträchtliche individuelle Schwankungen geltend machen.

Versuchen wir jetzt, an Hand der Blutzucker- und Phosphorkurven eine Analyse des Mechanismus der alimentären Hyperglykämie und dadurch eine Erklärung für die intermediär sich abspielenden Umsetzungen im Zuckerstoffwechsel zu gewinnen. Bei einer solchen Analyse erweist sich das von uns für die Blutzuckerkurve gegebene Einteilungsprinzip auch für die Betrachtung der Phosphorsäurekurve als äußerst fruchtbar. Die aufgestellten zwei Typen zeigen auch hinsichtlich des Ablaufs ihrer Phosphorkurve deutliche Differenzen (s. Kurve 1 und 2); während für den Assimilationstyp ein relativ rascher Abfall des anorganischen Phosphors, entsprechend dem Verlauf der Blutzuckerkurve, nachweisbar ist, zeigt der Resorptionstyp einen flachen, protrahierten Verlauf, der wieder vollkommen der Blutzuckerkurve parallel geht. Ergeben sich so zeitliche Verschiebungen im Verlauf der Kurve, so bestehen auch deutlich quantitative Unterschiede, die primäre Steigerung des anorganischen Phosphors ist bei dem reinen Assimilationstyp höher, der absolute Abfall beträchtlicher als beim Resorptionstyp. Die Kurve für den gesamtsäurelöslichen Phosphor läßt in den Fällen des reinen Resorptionstypus die Steigerung zum Schluß vollkommen vermissen. Die Mehrzahl unserer Fälle sind Mischformen.

In Kurve 1 sehen wir den Abfall des anorganischen Phosphors deutlich unterbrochen durch einen zweiten Anstieg. Daß in dieser Phase aus organischer Bindung leicht abspaltbarer Phosphor die Steigerung vortäuscht, glauben wir aus den Werten schließen zu können, die wir nach der *Schenck*schen Enteiweißung erhielten. Während der 30 Minuten nach Beginn des Versuchs ermittelte Wert nach *Schenck* mit dem Trichloressigsäurewert identisch ist, steht einem Phosphorsäurewert von 2,88 mg nach 95 Minuten ein *Schenck*-Wert von 3,46 entgegen. Dabei sind die Werte für den gesamtsäurelöslichen Phosphor selbstverständlich identisch (in beiden Fällen 20,3 mg-Proz.). Den beiden letzten Werten der Kurve von 2,86 bzw. 3,25 mg-Proz. entsprechen Werte von 3,38 bzw. 4,09, dies zu einer Zeit, in der der gesamtsäurelöliche Phosphor ein relatives Maximum erreicht. Wir sehen in der Differenz dieser Werte, die zu ganz bestimmten Zeiten auftritt, einen Beweis für unsere Auffassung von dem Zusammenhang dieser leicht abspaltbaren Form mit bestimmten Phasen des Kohlehydratstoffwechsels.

Gehen wir zur Anwendung dieser Befunde auf die Erklärung der Zuckerkurve und des Vorgangs der Zuckerassimilation über, so ergibt sich folgendes Bild: Dem ersten steilen Anstieg der Blutzuckerkurve, den wir als eine durch Reizwirkung bedingte Mobilisation von Kohlehydrat auffassen, geht

ein Anstieg der anorganischen Phosphorsäure parallel. Ob hier eine Einschwemmung von Phosphat aus dem Gewebe oder das Auftreten der leicht abspaltbaren organisch gebundenen Phosphorsäure vorliegt, läßt sich nicht ohne weiteres entscheiden. Fassen wir den ersten Anstieg der Blutzuckerkurve als bedingt durch die Mobilisation von Glykogen auf, so ließe sich die vermehrte Phosphorsäure wohl zwanglos aus dieser Quelle erklären. Es würde dieser Befund im Sinne der von uns vertretenen Anschauung über die erste Ursache der alimentären Hyperglykämie sprechen. Der weitere Verlauf der Kurve des anorganischen Phosphors deutet darauf hin, daß anorganisches Phosphat während der Kohlehydratassimilation von den Geweben der Blutbahn entzogen wird. Der tiefste Punkt der Phosphorkurve, der beträchtlich jenseits des Gipfels der Blutzuckerkurve liegt, deutet vielleicht den Höhepunkt der Assimilation an. In der Kurve des gesamtsäurelöslichen Phosphors würde der in einigen Fällen beobachtete Anstieg unmittelbar im Anschluß an die Glucosezufuhr ebenfalls im Sinne einer Mobilisation von Glykogen sprechen. Die im Verlauf der Kurve auftretenden Schwankungen sind vielleicht als Ausdruck des Transportes von Kohlehydrat-Phosphorsäureverbindungen aufzufassen, ebenso die regelmäßig zu beobachtende Steigerung am Schluß unserer Versuche, die bezeichnenderweise mit der hypoglykämischen Phase der Blutzuckerkurve zusammenfällt. Man könnte in diesem gegenseitigen Verhalten ein Zeichen für die Assimilation durch das Gewebe erblicken, durch welche einmal die Hypoglykämie bedingt wird und die andererseits zu einer vermehrten Abgabe assimilierten, vielleicht polymeren Kohlehydrats führt. Für diese Ansicht spricht auch das Fehlen dieser Steigerung bzw. der Blutzuckersenkung in den ausgesprochenen Fällen des Resorptionstypus. Für unsere Auffassung lassen sich vielleicht auch die Angaben von *Folin* und *Berglund* über den Befund vermehrten Zuckers nach der Hydrolyse in den Körperchen geltend machen, während die Hydrolyse im Plasma nur geringe Ausschläge ergibt. Es scheint uns aus allem dem die Bedeutung der Erythrocyten zumindest für den Transport der Kohlehydrate im Stoffwechsel, auf die wir bereits in unserer vorhergehenden Mitteilung kurz hingewiesen haben, eindringlich hervorzugehen. Ergänzt sich so Blutzucker- und Phosphorkurve zu einem einheitlichen Bilde für das Geschehen bei der Zuckerassimilation, so gibt uns die Betrachtung der Phosphorkurve über die sich abspielenden intermediären Vorgänge mehr Aufschluß als die Blutzuckerkurve allein. Ein Beispiel in diesem Sinne ist Kurve 3, bei welcher der anfängliche Verlauf der Blutzuckerkurve scheinbar vollkommen normal ist, bei der jedoch der protrahierte Abfall der Phosphorkurve mehr im Sinne eines Resorptionstyps liegt als aus der Blutzuckerkurve abzulesen ist, eine Auffassung, die durch das Fehlen des terminalen Anstiegs des gesamtsäurelöslichen Phosphors gestützt wird.

In einzelnen Fällen haben wir auch die Phosphorausscheidung in den während des Versuche stündlich entleerten Harnportionen verfolgt. Bereits *Harrop* und *Benedict* stellten in ihren Insulinversuchen einen Abfall der Phosphorausscheidung im Harn fest. Dieselben Erfahrungen machten *Blatherwick*, *Bell* und *Hill*, allerdings nicht in allen ihren Fällen, vielmehr finden sie nach Insulin manchmal eine vermehrte Ausscheidung. Ebenso beobachteten *Sokhey* und *Allan*[1]) bei Hunden nach Insulin und nach Glucose einen Abfall der Phosphorausscheidung im Harn. Zu gleichen Resultaten

[1]) Ref. Chem. Centralbl. 1925, II, 2319.

kommen *Eadie, Macleod* und *Noble*[1]), welche bei Hunden neben der schon anderwärts festgestellten Relation der Blutzucker- und Phosphorkurve auch das Absinken der Phosphorsäure im Harn beobachteten.

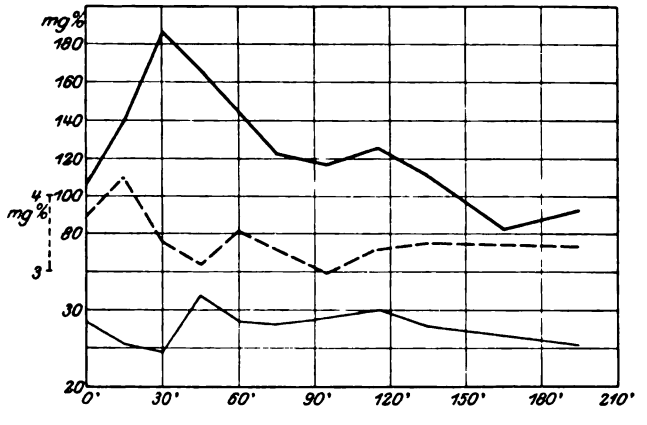


Abb. 3 (Versuch 22).

——— Blutzucker. ····· Anorg. P. ——— Gesamtsäurelösl. P.

In unseren Untersuchungen zeigt sich überall ein Absinken der Phosphorsäurewerte.

Tabelle II.

Phosphorausscheidung durch den Harn nach Glucosezufuhr.

Harnmenge in ccm P in mg	Versuch 8 24. XII. 1925 *Berg.* 70 g	Versuch 9 26. XII. 1925 *Leip.* 70 g	Versuch 11 1. XII. 1925 *Frey.* 60 g	Versuch 20 19. I. 1926 *Barr.* 80 g	Versuch 21 28. I. 1926 *Alb.* 100 g	Versuch 28 9. II. 1926 *Barr.* 80 g	Bemerkungen
ccm	76	60	57	115	19	175	Nüchtern
mg	37,6	36,6	34,3	23,0	31,8	77,3	
ccm	46	40	40	115	18	98	1. Stunde
mg	7,8	22,5	9,9	19,4	23,6	31,3	
ccm	47	60	90	90	19	65	2. Stunde
mg	5,6	17,2	5,6	11,7	13,6	22,3	
ccm	83	47	140	90	15	49	3. Stunde
mg	7,0	24,9	1,4	22,6	4,0	21,9	
ccm	160	30	135	50	17	77	4. Stunde
mg	14,5	41,6	3,8	40,5	3,1	31,8	

Die Periode der geringsten Ausscheidung fällt mit der Periode des Tiefstandes im Blute zusammen. In den Fällen, wo die Untersuchung lange genug fortgeführt wurde, zeigt sich späterhin eine kompensatorische Ausschwemmung der Phosphorsäure durch den Harn. Wir müssen in

[1]) Amer. journ. of physiol. 72, 614 bis 628, 1925.

dieser Hemmung der Phosphorausscheidung während der Kohlehydratassimilation wohl einen Regulationsmechanismus erblicken, durch den dem Organismus das für diese Phase des Stoffwechsels so wichtige Phosphation erhalten bleibt.

Auf die Versuche, in denen 20 und 100 g Glucose in Abstand von 1 Stunde gegeben wurde, wollen wir nicht näher eingehen, da sie im wesentlichen nichts Neues bringen. Sie zeigen deutlich den Einfluß der zweiten Zuckergabe auf die Phosphorkurve, der sich in einem weiteren Abfall zu erkennen gibt.

IV. Vergleich zwischen arteriellem Kapillarblut und Venenblut.

Ein Vergleich zwischen gleichzeitig entnommenen Proben des arteriellen Kapillarblutes und des Venenblutes erschien uns um so mehr angezeigt, als durch die Untersuchungen von *Foster*[1]) bei alimentärer Hyperglykämie am Menschen, sowie durch die Tierversuche von *Frank, Nothmann* und *Wagner*[2]) bei intraarterieller Injektion von Insulin und gleichzeitiger Untersuchung des zufließenden arteriellen und abfließenden venösen Blutes die Bedeutung der Peripherie für die Kohlehydratassimilation sichergestellt ist. Wir bringen zu dieser Frage vier Versuche, bei denen die Entnahmen so vorgenommen wurden, daß die Punktion der kaum gestauten Armvene zeitlich — mit Ausnahme von Versuch 37 — mit der Entnahme aus der Fingerbeere zusammenfiel. Wie Kurve 4 illustriert,

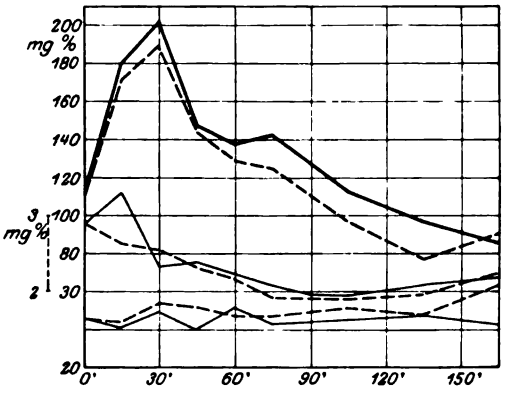


Abb. 4 (Versuch 40).

Oberes Kurvenpaar: Blutzucker. ——— Arteriell. ····· Venös.
Mittleres Kurvenpaar: Anorg. P. ——— Arteriell. ····· Venös.
Unteres Kurvenpaar: Gesamtsäurelösl. P. — — Arteriell. ····· Venös.

sind die Nüchternwerte in beiden Blutarten nur wenig voneinander different. Während des ersten Anstiegs des Blutzuckers gehen beide Werte parallel. Die in einzelnen Kurven feststellbaren geringen Überkreuzungen zwischen arteriellem und venösem Blutzuckerwert sind unschwer aus den zeitlichen

[1]) Journ. of biol. Chem. 55, 303, 1923.
[2]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 110, 225, 1925.

Tabelle III.

Untersuchungen am arteriellen und venösen Blut.

Nr.	Name und Datum	Blut		Zeit in Minuten									
				0	15	30	45	60	75	90	105	135	155
43	*Dol.*	Zucker	a	105	189	212	174	162	149	—	107	102	—
	10. VI. 1926		v	103	192	176	123	101	102	—	115	116	—
	65 g Glucose per os	Anorganischer P .	a	4,03	4,05	3,49	3,81	3,14	3,07	—	3,08	3,26	—
			v	4,04	3,78	4,11	3,73	3,14	2,94	—	3,13	3,32	—
		Gesamtsäurelösl. P	a	26,8	26,0	25,3	26,5	27,8	25,1	—	28,5	29,6	—
			v	26,8	27,3	26,9	21,5	22,0	25,0	—	26,8	26,3	—
40	*Fisch.*	Zucker	a	109	180	202	148	138	143	—	114	97	86 *)
	21. V. 1926		v	110	173	190	144	129	125	—	97	78	91 *)
	75 g Glucose per os	Anorganischer P .	a	2,91	3,30	2,36	2,40	2,25	2,08	—	1,98	2,12	2,23
			v	2,93	2,65	2,53	2,36	2,18	1,94	—	1,94	1,98	2,26
		Gesamtsäurelösl. P	a	26,3	25,7	27,5	25,3	28,1	26,2	—	26,5	26,9	26,0
			v	26,1	26,1	28,4	28,0	27,0	27,1	—	28,1	27,0	31,0
37	*Wasch.*	Zucker	a	100	110	132	158	160	—	107	111 †)	—	112 ††)
	29. IV. 1926		v **)	95	105	147	147	142	—	93	114	—	121
	60 g Glucose per os	Anorganischer P .	a	4,21	3,02	3,21	2,64	2,66	—	2,69	2,63	—	3,18
			v **)	4,31	3,33	2,72	2,64	3,35	—	3,85	2,50	—	2,76
		Gesamtsäurelösl. P	a	27,3	29,2	25,0	26,2	24,0	—	26,9	24,9	—	26,6
			v **)	27,2	24,4	27,5	24,1	25,2	—	28,8	29,3	—	29,5
38	*Salt.*	Zucker	a	112	107	133	137	149	129	125	—	118 *†)	107
	4. V. 1926		v	107	107	133	124	127	121	96	—	98 *†)	104
	65 g Glucose per os	Anorganischer P .	a	3,54	3,98	3,23	3,47	3,10	3,32	3,02	—	3,15	2,95
			v	3,75	3,28	3,01	3,35	3,02	2,95	2,68	—	3,14	3,15
		Gesamtsäurelösl. P	a	32,1	31,7	30,6	34,5	30,9	32,4	30,2	—	30,0	27,4
			v	32,1	31,2	32,1	30,0	28,7	35,2	31,1	—	32,3	29,6

*) Letzter Wert nach 165 Minuten. — **) Die venösen Werte sämtlich 5 Minuten nach den arteriellen entnommen. — †) Entnahme nach 120 Minuten. — ††) Entnahme nach 150 Minuten. — *†) Entnahme nach 125 Minuten.

Differenzen zu erklären (Versuch 37) oder liegen innerhalb der Fehlergrenzen der Methodik (Versuch 43). Während die arterielle Kurve noch ansteigt, beginnt in der Kurve des venösen Blutes — mit Ausnahme von Versuch 40 — bereits der Abfall. Die hier auftretenden Differenzen übersteigen die Fehlergrenzen der Methodik bei weitem. Der Blutzucker im venösen Blute sinkt immer schon auf den Ausgangswert oder darunter, während der arterielle noch beträchtlich hoch liegt. Nimmt so die Divergenz beider Kurven im Abfall der arteriellen Kurve zu, so kommt es weiterhin zu einer Konvergenz, die in drei Fällen zu einer Überkreuzung der arteriellen und venösen Kurve führt. Die Differenzen im aufsteigenden Ast unserer Kurve sind durchweg nicht so groß, wie die von *Foster* gefundenen.

Ganz charakteristisch ist die Kurve für den anorganischen Phosphor in beiden Blutarten. Während die Nüchternwerte identisch sind oder nur um weniges auseinander liegen, sehen wir in den Fällen, wo wir den typischen, nach Glucosezufuhr auftretenden Anstieg beobachten können, den anorganischen Phosphor im venösen Blute absinken. In Versuch 43 fehlt zwar dieser initiale Anstieg, hier sind wir bei dem rapiden Ansteigen offenbar zu spät gekommen, die Divergenz zwischen arteriellem und venösem Blut ist aber deutlich ausgeprägt. Sie fehlt nur in Versuch 37, der unter unserem gesamten Material als einziger sofort einen Abfall des anorganischen Phosphors auch im arteriellen Blute aufweist. Durchschnittlich liegt im weiteren Verlauf die Kurve für den venösen anorganischen Phosphor unter der Kurve des arteriellen. Die ab und zu auftretenden Überkreuzungen möchten wir als Ausdruck einer Abspaltung aus lockerer organischer Bindung ansehen, schon aus dem Grunde, weil sie regelmäßig mit einer Steigerung des gesamtsäurelöslichen Phosphors verbunden sind (s. besonders Fall 37). Für den gesamtsäurelöslichen Phosphor sind die Ausgangswerte ausnahmslos innerhalb der Fehlergrenzen identisch. Im weiteren Verlauf der Kurve treten immer größere Unterschiede zwischen beiden Blutarten auf. Typisch scheint uns hier wieder die in der zweiten Hälfte des Versuchs auftretende Erhebung des venösen, gesamtsäurelöslichen Phosphors über den Wert im arteriellen Kapillarblut zu sein, die allerdings Fall 43 vermissen läßt. Für den Mechanismus der Zuckerassimilation glauben wir aus unseren Kurven folgende Schlüsse ziehen zu können: Die im Anfang einsetzende Mobilisation des Zuckers *und der Phosphorsäure* führt zunächst zu einer Adsorption der *Phosphorsäure* durch das Gewebe (Muskulatur): Anstieg im arteriellen, Abfall im venösen Blute. Dieser vorbereitenden Phase folgt nun die eigentliche Assimilation, charakterisiert durch den rapiden Abfall des Zuckers im venösen Blute, parallel zum Abfall der anorganischen Phosphorsäure. Schubweise wird gleichzeitig organisch gebundene Phosphorsäure aus dem Gewebe abgegeben. Dieser gesteigerte Transport erreicht seinen Höhepunkt zur Zeit des Tiefpunktes der arteriellen Zuckerkurve. Gleichzeitig setzt aber eine Zuckerabgabe aus dem Gewebe ein, der Blutzucker im venösen Blut steigt an, die Blutzuckerkurven konvergieren oder überkreuzen sich. Man könnte daran denken, daß die Muskulatur den aus der Blutbahn abgefangenen körperfremden Zucker nun unverändert der Leber zur Synthese überantwortet. Wahrscheinlicher scheint uns die Annahme, daß an Ort und Stelle nicht gebrauchter, bereits assimilierter Zucker, vielleicht in Form eines Phosphorsäureesters der Leber als dem hauptsächlichen Stapelorgan zugeführt wird. In diesem Sinne sprechen unsere Zahlen für den gesamtsäurelöslichen Phosphor. Außerdem auch die Untersuchungen von

Lundsgaard und *Holbøll*[1]) über die Einwirkung von Muskelgewebe und Insulin auf Glucose in vitro.

V. Intravenöse Glucosezufuhr.

Von vornherein war zu erwarten, daß sich die Phosphorkurve nach intravenöser Zufuhr von der nach peroraler wesentlich unterscheiden müsse. Schon die in der ersten Mitteilung dieser Reihe[2]) erhobenen Befunde deckten ein prinzipiell verschiedenes Verhalten je nach dem Wege der Zufuhr des Zuckers auf. Bezüglich der Literatur verweisen wir auf die dort gegebene Zusammenstellung.

Wir haben die Glucose in 50proz. Lösung möglichst rasch innerhalb von 3 bis 10 Minuten injiziert. Die Dosis betrug 60 ccm = 30 g Glucose. Wir möchten hier bemerken, daß wir in unseren letzten Fällen im Anschluß an die Injektion Thrombosen feststellen mußten, und sehen uns also genötigt, die in der ersten Mitteilung aufgestellte Behauptung von der Harmlosigkeit der Injektion so hochkonzentrierter Zuckerlösungen richtigzustellen. Übereinstimmend trat in allen Fällen im Anschluß an die Injektion starkes Hungergefühl auf. Um sicher zu sein, daß die Veränderungen im Blute nicht durch eine eventuelle Verwässerung im Anschluß an die Injektion der hypertonischen Lösung vorgetäuscht werden, haben wir in der Mehrzahl der Versuche wiederholt im Laufe der Entnahmen Erythrocyten (*Buerker*sche Methode) und Hämoglobin nach *Sahli* bestimmt. Die Werte änderten sich während des Versuchs in keiner Weise, so daß wir eine Hydrämie ausschließen können. Nachstehend bringen wir das Protokoll von fünf Versuchen (31, 33, 35, 41, 42). In zwei Fällen wurde an die Injektion im Abstand von 80 bzw. 120 Minuten eine perorale Gabe von Glucose entsprechend dem Körpergewicht angeschlossen.

Bei der Betrachtung der Blutzuckerkurve fällt vor allem das ungemein rasche Verschwinden des Zuckers aus dem Blute auf. Mit Ausnahme von Versuch 35, in dem die Hyperglykämie durch 2 Stunden andauert, ist überall der Ausgangswert des Blutzuckers nach längstens 1 Stunde erreicht. Dieses rasche Verschwinden nach Überschwemmung mit relativ so enormen Zuckermengen wird besonders imposant, wenn wir die Versuche 31, 41 und 42 beobachten. In Versuch 42 finden wir z. B. 5 Minuten nach Beendigung der Injektion einen Blutzucker von 388 mg-Proz. Veranschlagen wir die Blutmenge der Versuchsperson mit etwa 5 Litern, so zeigt sich, daß von den injizierten 30 g nach dieser Zeit rund 50 Proz. bereits die Blutbahn verlassen haben. Dabei kann die Ausscheidung durch den Harn nur eine untergeordnete Rolle spielen, denn der unmittelbar nach dieser Blutentnahme entleerte Harn zeigte nur eine Zuckermenge von 2,1 g. Ähnliche Verhältnisse finden wir im Fall 31, bei dem der Blutzucker 10 Minuten nach der Injektion nur mehr 238 mg-Proz. beträgt, während die gleichzeitig entleerte Harnportion 3,33 g Zucker enthielt. Dieses enorm rasche Verschwinden des Zuckers war bereits *Bang* aufgefallen, der sich in seinen Tierversuchen vergebens bemühte, den Verbleib dieses verschwundenen

[1]) C. r. de la soc. de biol. **92**, 115 bis 116; Journ. of biol. Chem. **62**, 453 bis 469, 1924/25; vgl. dagegen die negativen Ergebnisse von *Barbour*. (Journ. of biol. Chem. **67**, 23, 1926) und *Paul* (ebendaselbst, **68**, 425, 1926).

[2]) Diese Zeitschr. **167**, 77, 1926.

Zuckers restlos aufzuklären. Hervorzuheben wäre noch, daß mit Ausnahme von Versuch 41 eine nennenswerte Hypoglykämie nach der Injektion nicht festzustellen war.

Das Verhalten des anorganischen Phosphors zeigt in allen Fällen gegenüber der Kurve nach peroraler Zufuhr deutliche Abweichungen. Die für letztere so charakteristische initiale Steigerung fehlt vollkommen. Der

Tabelle IV.

Versuch 31, 27. Februar. *A. Sp.*, 21 Jahre, Elektriker, Ulcus molle.

Zeit	Blut			Harn			Bemerkungen
	Zucker	Anorganischer Phosphor	Gesamtsäurelöslicher Phosphor	Menge ccm	Zucker	Anorganischer Phosphor	
8h40′	91	2,66	23,3	—	—	—	Nüchternwert
8 50—9h	—	—	—	—	—	—	Inj. 30 g Glucose, intravenös
9 10	238	2,67	22,8	370	0,9 Proz. = 3,3 g	39,3 = 14,75 mg pro Stde.	Harn von 6h30′ bis 9h10′
9 30	99	2,08	25,6	—	—	—	
9 50	91	2,09	25,5	—	—	—	
10 05	97	2,00	23,2	—	—	—	
10 15	—	—	—	82	0,5 Proz. = 0,4 g	9,95 mg	
10 20	97	2,21	24,3	—	—	—	
10 35	101	2,47	23,0	—	—	—	
10 55	96	2,30	28,0	—	—	—	
11 15	102	2,85	25,3	49	Spur	4,08 mg	
11 35	107	2,76	28,3	—	—		

Tabelle V.

Versuch 33. 9. März 1926. *A. J.*, 30 Jahre, Näherin, Acne vulgaris.

Zeit	Blut			Harn			Bemerkungen
	Zucker	Anorganischer Phosphor	Gesamtsäurelöslicher Phosphor	Menge ccm	Zucker	Anorganischer Phosphor	
8h45′	99	3,02	24,5	—	—	—	Nüchternwert Erythrocyten 3940000. Hb. 87
8 47 —8h50′	—	—	—	—	—	—	30 g Glucose i. v.
9	223	2,68	23,3	—	—	—	
9 20	156	2,25	23,2	—	—	—	Erythrocyten 3780000. Hb. 85
9 40	101	2,31	25,2	—	—	—	
10	104	2,12	18,6	—	—	—	
10 20	106	2,67	20,6	—	—	—	Erythrocyten 3900000. Hb. 88
10 40	104	2,36	20,8	—	—	—	
11	—	—	—	340	0,5 Proz. = 1,7 g	—	
11 10	100	2,44	25,7	—	—	—	
11 30	96	—	23,9	—	—	—	

Tabelle VI.

Versuch 35, 18. März 1926. *Emma S.*, 28 Jahre, Private, Ecthyma.

Zeit	Blut			Harn			Bemerkungen
	Zucker	Anorganischer Phosphor	Gesamtsäurelöslicher Phosphor	Menge ccm	Zucker	Anorganischer Phosphor mg	
9h00′	136	3,20	23,0	—	—	—	Nüchternwert
9 10 –9h15′	—	—	—	—	—	—	30 g Glucose i. v.
9 25	323	2,50	21,6	—	—	—	Erythrocyten 4960000. Hb 92
9 50	—	—	—	122	4,3 Proz. = 5,25 g	20,6	Menge von 7h30′ bis 9h50′
9 55	224	2,12	22,6	—	—	—	Erythrocyten 4980000. Hb 92
10 05	205	2,13	22,6	—	—	—	
10 20	188	2,51	20,9	—	—	—	
10 35	164	2,50	21,9	—	—	—	Erythrocyten 4920000. Hb 92
10 50	—	—	—	26	2,6 Proz. = 0,58 g	9,96	
10 55	142	3,24	23,4	—	—	—	
11 15	118	2,12	18,4	—	—	—	
11 35	98	1,90	19,5	—	—	—	Erythrocyten 4930000. Hb 93
11 50	—	—	—	12	Spur	2,45	

Tabelle VII.

Versuch 41, 28. Mai 1926. *Robert B.*, 22 Jahre, Mediziner.

Zeit	Blut			Harn			Bemerkungen
	Zucker	Anorganischer Phosphor	Gesamtsäurelöslicher Phosphor	Menge ccm	Zucker	Anorganischer Phosphor mg	
8h05′	122	2,67	25,3	—	—	—	Nüchternwert
8 15 –8h18′	—	—	—	—	—	—	30 g Glucose i. v.
8 20	—	—	—	52	—	23,2	Menge von 7h20′ bis 8h20′
8 25	290	2,67	23,5	—	—	—	
8 40	172	2,30	23,9	—	—	—	
8 55	103	2,23	24,8	—	—	—	
9 10	84	2,26	25,8	—	—	—	
9 20	—	—	—	51	2,8 Proz. = 1,4 g	15,6	
9 25	77	2,72	25,3	—	—	—	
9 55	92	—	24,8	—	—	—	
10 20	—	—	—	48	0	8,8	
10 25	86	2,16	23,9	—	—	—	
10 30	—	—	—	—	—	—	70 g Glucose per os
10 45	120	2,13	21,9	—	—	—	
11 00	135	2,26	21,2	—	—	—	
11 15	154	2,25	21,2	—	—	—	
11 20	—	—	—	40	0	15,6	
11 30	145	2,41	22,3	—	—	—	
12 00	145	2,39	22,0	—	—	—	
12 20	—	—	—	58	0	20,9	
12 30	139	2,12	23,5	—	—	—	
13 00	97	2,10	22,1	—	—	—	
13 20	—	—	—	152	0	17,4	

Tabelle VIII.

Versuch 42, 8. Juni 1926. *Ludwig P.*, 22 Jahre, Mediziner.

Zeit	Blut			Harn			Bemerkungen
	Zucker	Anorganischer Phosphor	Gesamtsäurelöslicher Phosphor	Menge ccm	Zucker	Anorganischer Phosphor mg	
8h23′	102	3,36	33,5	—	—	—	Nüchternwert
8 25 –8 28′	—	—	—	—	—	—	30 g Glucose i. v.
8 30	388	3,36	26,6	—	—	—	
8 35	—	—	—	175	1,2 Proz. = 2,1 g	—	
8 45	210	3,57	30,6	—	—	—	
9 00	143	3,57	31,7	—	—	—	
9 15	103	3,26	32,1	—	—	—	
9 30	90	3,03	30,7	—	—	—	
9 45	90	3,00	34,4	—	—	—	
9 50	—	—	—	—	—	—	70 g Glucose per os
10 05	133	3,31	25,8	—	—	—	
10 20	169	3,03	27,9	—	—	—	
10 35	145	3,17	27,4	—	—	—	
10 50	120	3,03	28,5	—	—	—	
11 05	113	2,86	27,3	—	—	—	
11 20	91	2,80	28,1	—	—	—	
11 30	—	—	—	130	0,1 Proz. = 0,13 g	—	
11 50	128	2,94	28,6	—	—	—	
12 20	96	2,94	26,8	—	—	—	
12 50	—	—	—	60	0	—	

Abfall erfolgt im allgemeinen rascher, die Kurve hält sich länger auf einem tiefen Niveau und strebt einer langsam abfallenden Geraden zu. So wird im Versuch 35 der tiefste Abfall erst nach 140 Minuten mit Abschluß des Versuchs erreicht. In diesem Verhalten zeigt die Kurve nach intravenöser Zufuhr Ähnlichkeit mit dem bei Versuch 37 und 38 — rein resorptive Typen — festgestellten Verlauf. Diese Analogie erscheint uns mit Rücksicht auf unsere theoretischen Vorstellungen nicht ohne Bedeutung zu sein. Wenig Charakteristisches bietet die Kurve des gesamtsäurelöslichen Phosphors. Von der nach peroraler Zufuhr beobachteten Steigerung läßt sich hier nichts feststellen. Hervorheben möchten wir nur, daß wir nach peroraler Zufuhr niemals ein derartiges Absinken beobachten konnten wie in dieser Versuchsanordnung. Auch hier bestehen weitgehende Analogien mit den Fällen des reinen Resorptionstyps (s. Versuch 37 und 38). Die Umgehung des Zentralorgans scheint die Assimilation zu verzögern. Auf das bewundernswert rasche Abfangen des körperfremden Zuckers setzt die Assimilation in relativ langsamem Tempo ein.

Besonderes Interesse verdienen die Fälle, in denen wir der intravenösen Injektion eine perorale Zuckergabe nachfolgen ließen. Der Einfluß der zweiten Zuckergabe auf den Blutzucker äußert sich in einem relativ hohen Anstieg, dem ein protrahierter Abfall folgt, der im Versuch 42 entgegen dem sonstigen Verhalten der Versuchsperson von einer deutlichen zweiten Zacke gefolgt ist. In der Kurve des anorganischen Phosphors kommt die perorale Zuckergabe kaum zum Ausdruck, im Gegensatz zu Versuch 25

und 27, wo bei Zufuhr von 20 und 100 g Glucose in Abständen von einer Stunde per os die neuerliche Zuckerzufuhr mit einem weiteren Abfall beantwortet wird. Auch der gesamtsäurelösliche Phosphor wird durch die der intravenösen Injektion folgende perorale Zuckergabe nicht in dem uns sonst gewohnten Sinne beeinflußt. Dieses eigenartige Verhalten der Blutzucker- und Phosphorkurven möchten wir so erklären, daß durch die intravenöse Injektion so großer Zuckermengen die Assimilationsorte gewissermaßen blockiert sind und durch diese Blockade der Typus des ganzen Ablaufs verschoben wird.

Die Ausscheidung der Phosphorsäure durch den Harn zeigt in den hier untersuchten Fällen das gleiche Verhalten, das wir nach peroraler Zufuhr kennengelernt haben. Die stündliche Ausscheidung fällt auf oft minimale Werte, der Organismus spart sein Phosphat ein. Auffallend ist die Tatsache, daß im Versuch 41 auf die perorale Zufuhr eine vermehrte Ausschwemmung von Phosphat erfolgt. Die unmittelbare Wirkung der peroralen Zufuhr auf den Phosphatstoffwechsel kommt durch die vorangegangene intravenöse Injektion nicht zur Entfaltung, die sonst beobachtete Phosphatretention fehlt.

Unser Dank gebührt allen Kollegen, die sich uns zu den Versuchen zur Verfügung gestellt haben, ganz besonders aber Herrn *Robert Berger*, der uns bei der Ausführung dieser und der folgenden Arbeiten weitgehend unterstützt hat.

Zusammenfassung.

1. Nach peroraler Glucosezufuhr zeigt die Kurve des anorganischen Phosphors regelmäßig in der ersten Viertelstunde nach der Zuckergabe einen Anstieg. Der darauf folgende Abfall erreicht seinen tiefsten Punkt zu einer Zeit, in der die Blutzuckerkurve ihren Höhepunkt längst überschritten hat. An der Kurve des gesamtsäurelöslichen Phosphors ist ein Anstieg gegen Ende des Versuchs, der mit dem tiefsten Punkt der Blutzuckerkurve zeitlich zusammenfällt, typisch. In Übereinstimmung mit dem Assimilations- und Resorptionstyp der Blutzuckerkurve läßt sich auch für die Phosphorkurve ein entsprechender Verlauf feststellen.

2. Nach peroraler Glucosezufuhr sinken die Werte für die Phosphorsäureausscheidung im Harn ab. Der verminderten Ausscheidung folgt eine vermehrte Ausschwemmung.

3. Der Vergleich zwischen venösem und arteriellem (Kapillar-) Blut ergibt während des Anstiegs der Blutzuckerkurve weitgehenden Parallelismus beider Werte. Der Abfall setzt beim venösen Blut früher ein als beim arteriellen und ist weit beträchtlicher. Im weiteren Verlauf steigt der Zucker des venösen Blutes an, es kommt zu einer Überkreuzung beider Kurven. In den Werten für den anorganischen Phosphor läßt das venöse Blut den initialen Anstieg vermissen. Gegen Ende des Versuchs ist ein stärkerer Anstieg des gesamtsäurelöslichen Phosphors im venösen Blute gegenüber dem arteriellen bemerkenswert.

4. Beträchtliche Mengen (30 g) intravenös injizierter Glucose verschwinden sehr schnell aus der Blutbahn. Nach 1 Stunde ist der Ausgangswert des Blutzuckers meist erreicht. Eine nennenswerte Hypoglykämie ist kaum festzustellen. Die Kurve für den anorganischen Phosphor fällt ohne initialen Anstieg ab und bleibt längere Zeit auf niedrigem Niveau. Der gesamtsäurelösliche Phosphor zeigt auffallend tiefe Werte. Die Kurven sind denen des Resorptionstypus ähnlich. Die Phosphorsäureausscheidung im Harn sinkt, analog dem nach peroraler Zufuhr beobachteten Verhalten, beträchtlich ab.

5. Die der peroralen Glucosezufuhr vorangehende intravenöse Glucoseinjektion verschiebt den Charakter des Ablaufs der Blutzucker- und Phosphorsäurekurven im Sinne des Resorptionstypus.

Beiträge zum Problem des Blutzuckers.

V. Mitteilung:

Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 8. Fructose und Galaktose.

Von

H. K. Barrenscheen, Friedrich Doleschall und **Ludwig Popper.**

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 23. Juli 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I.

In der vorangehenden Mitteilung haben wir der Überzeugung Ausdruck gegeben, daß das Studium der Phosphorsäurekurve uns über den Vorgang der Assimilation mehr Aufschluß zu geben imstande sei, als die Blutzuckerkurve allein. War diese Auffassung richtig, so mußten sich Differenzen ganz besonders bei der Untersuchung anderer Zuckerarten als der dem Organismus adäquaten Glucose ergeben. Wir haben für unsere Untersuchungen die Fructose und Galaktose gewählt, da gerade diese Zucker auch von der Klinik zur Beurteilung der Kohlenhydratassimilation eingehende Berücksichtigung gefunden haben. Beide Zuckerarten sind zwar vorwiegend auf ihre Ausscheidung durch den Harn geprüft worden, die Beeinflussung des Blutzuckers hat bisher relativ wenig Beachtung gefunden. Für die Wahl der Fructose waren uns noch andere Gesichtspunkte mehr theoretischer Natur maßgebend.

II.

Fructose.

Die Blutzuckerkurve nach Fructosezufuhr ist in neuerer Zeit von einer Reihe von Autoren untersucht worden [*Isaac*[1]), *Mac Lean* und *de Wesselow*[2]), *Spence* und *Brett*[3]), *Kahler* und *Machold*[4]), *Folin* und

[1]) Med. Klinik 1920, S. 1211.
[2]) Quart. Journ. of Med. 14, 103 bis 119, 1921.
[3]) Lancet 1921, S. 1362.
[4]) Wien. klin. Wochenschr. 1922, Nr. 18.

Tabelle 1.

Fructoseversuche.

Nr.	Name und Datum	Blut	Zeit in Minuten 0	15	30	45	60	75	95	115	135	165	195	Bemerkungen
6	*Dol.* 19. XI. 1925	Zucker	87	103	116	105	102	92	97	80	79	89	82	65 g Fructose, Ausscheidung i. Harn ∅
		Anorganischer Phosphor	3,59	4,42	3,53	3,43	3,14	2,60	2,79	3,07	3,45	3,43	3,41	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	30,4	27,3	27,3	28,0	27,6	28,0	26,0	24,7	27,6	28,5	29,7	
23	*Berg.* 30. I. 1926	Zucker	110	129	122	118	109	111	90	100	102	82	83	70 g Fructose, Ausscheidung i. Harn ∅
		Anorganischer Phosphor	4,49	5,03	3,60	3,46	2,70	2,58	2,26	2,82	3,00	2,95	3,00	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	28,2	28,3	27,4	26,7	22,9	24,6	25,3	24,8	27,7	24,1	27,0	
19	*Frey.* 18. I. 1926	Zucker	106	118	112	108	109 *)	97 **)	111 †)	100 ††)	107 *†)	—	102	
		Anorganischer Phosphor	4,03	4,03	3,30	3,23	3,45	3,19	3,02	3,11	3,33	—	3,33	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	30,0	26,7	25,0	23,1	24,6	26,1	30,0	30,0	27,3	—	23,9	60 g Fructose, Ausscheidung +
29	*Alb.* 11. II. 1926	Zucker	98	118	123	129	116	104	103	105	91	90	92	100 g Fructose, Ausscheidung 0,11 g
		Anorganischer Phosphor	4,82	5,35	3,81	3,45	3,18	3,94	3,54	2,98	2,61	2,91	3,08	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	27,6	26,6	30,0	24,5	27,0	28,9	27,6	26,7	24,3	25,8	25,0	

*) Nach 70 Minuten. — **) Nach 90 Minuten. — †) Nach 105 Minuten. — ††) Nach 130 Minuten. — *†) Nach 155 Minuten.

Berglund[1]), *Foster*[2]), *Bodansky*[3])], Übereinstimmend wird angegeben, daß die alimentäre Hyperglykämie nach Fructose hinter der nach äquivalenten Mengen Glucose zu beobachtenden wesentlich zurückbleibt. Daß trotzdem Fructose im Blute kreist, dafür spricht einmal die nach größeren Gaben beobachtete Ausscheidung durch den Harn, dann aber auch die Untersuchung von *Isaac* über die Partialkonzentration beider Zucker im Blut. Wir haben mit der von uns beschriebenen Versuchsanordnung acht Versuche ausgeführt, deren Ergebnisse vollkommen gleichsinnig ausgefallen sind. Wir geben in Tabelle I vier davon ausführlicher wieder.

Übereinstimmend zeigt in allen Fällen die Blutzuckerkurve einen auffallend flachen Verlauf, der namentlich in die Augen springt, wenn wir die in der vorangehenden Arbeit angeführten Blutzuckerkurven bei den gleichen Versuchspersonen und der äquivalenten Menge Glucose betrachten. In erster Linie fehlt der für die Glucose so charakteristische rasche Anstieg. In ihrem Anfangsteil gleicht die Kurve vollkommen dem bei der Glucose als rein resorptivem Typ beschriebenen, doch ist der Gipfelpunkt meist schon nach 30 Minuten erreicht. Auch im Abfall zur Norm zeigt sich, wenn wir von Versuch 29, in dem 100 g Fructose gegeben wurden, absehen, keine wesentliche Differenz gegenüber der Glucose. Die nachfolgende Hypoglykämie ist jedoch in allen Fällen geringer als die bei Glucose beobachtete. Man könnte dieses abweichende Verhalten der Fructosekurve mit der schlechteren Resorption dieses Zuckers zu erklären versuchen. Und tatsächlich hat man auch diese geringere Resorptionsfähigkeit für Fructose zur Erklärung ihrer besseren Ausnutzung durch den Diabetiker herangezogen. Im Sinne einer solchen Erklärung würden auch die Befunde von *Cori*[4]) sprechen, nach denen der Absorptionskoeffizient der Fructose beträchtlich unter dem der Glucose liegt. Daß diese Auffassung nicht voll berechtigt ist und daß für das Verhalten der Fructose auch andere Gründe mit herangezogen werden müssen, geht eindeutig aus unseren Kurven der anorganischen Phosphorsäure hervor. Wir sehen hier in allen Fällen nach der — nur in Versuch 19 vermißten — initialen Steigerung die Kurve äußerst rasch und auf tiefe Werte absinken. Dieser Abfall ist bei einigen Versuchspersonen sogar beträchtlicher als der nach Glucose auftretende. Während bei dieser gegen Ende unserer Versuchszeit die Phosphorwerte schon ansteigen und den Ausgangswert vielfach erreichen, finden wir in den Fructoseversuchen den Ausgangswert meist nicht erreicht. Die Kurve bleibt dauernd auf niedrigem Niveau, wohl ein Zeichen für die fortdauernde Resorption und Assimilation. Die Zahlen für den gesamtsäurelöslichen Phosphor bieten nichts Charakteristisches, die der Glucose eigene Steigerung am Schluß des Versuchs fehlt oder ist nur wenig ausgesprochen. (Siehe Abb. 1.)

Für die Frage der Assimilation der Fructose glauben wir aus unseren Kurven folgendes ablesen zu können. Auffällig ist zunächst die starke Diskrepanz zwischen Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. Während in

---

[1]) Journ. of biol. Chem. **51**, 213, 1922.
[2]) Ebendaselbst **55**, 291, 1923.
[3]) Ebendaselbst **56**, 287, 1923.
[4]) Journ. of biol. Chem. **66**, 691, 1925.

der Blutzuckerkurve die Reizwirkung des zugeführten Zuckers kaum zum Ausdruck kommt, zeigt sich diese in der Kurve des anorganischen Phosphors sehr deutlich. Dem mehr resorptiven Typ der Blutzuckerkurve steht ein ausgesprochener Assimilationstyp der Phosphorkurve gegenüber. Man könnte dieses gegensätzliche Verhalten so deuten, daß die Leber nach anfänglicher Durchbrechung ihrer Sperre die zuströmende Fructose mit

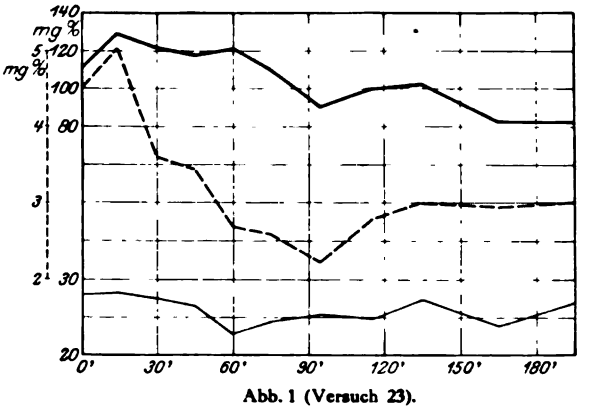


Abb. 1 (Versuch 23).

——— Blutzucker. ····· Anorg. P. ——— Gesamtsäurelösl. P.

großer Energie zurückhält und assimiliert. Für die zentrale Rolle, welche die Leber bei der Assimilation der Fructose spielt, liegen eine ganze Reihe experimenteller und klinischer Angaben vor[1]). Wir glauben, daß auch unsere Kurven in diesem Sinne aufzufassen sind. Neben der Phosphorkurve spricht dafür auch die geringe Hypoglykämie, an deren Zustandekommen, wie unsere Untersuchungen am arteriellen und venösen Blute zeigen, in erster Linie die Peripherie beteiligt zu sein scheint. Wir möchten aber aus unseren Ergebnissen mit aller Vorsicht noch einen weitergehenden Schluß ziehen. Bereits *Pringsheim*[2]) hat rein theoretisch darauf hingewiesen, daß die hypothetische, körpereigene γ-Glucose strukturell der d-Fructose nahestehen dürfte. Unsere Versuchsergebnisse scheinen im Sinne der *Pringsheim*schen Auffassung zu sprechen. Fassen wir die Phosphorylierung als den ersten Schritt zur Assimilation auf, von dem der Weg zur Synthese oder Verbrennung führt, dann könnte man annehmen, daß dieser Vorgang der Veresterung mit Phosphorsäure für die Fructose in der Leber besonders leicht und rasch vonstatten geht, daß somit die Fructose dem körpereigenen Zucker durch ihre Struktur näher verwandt ist als die gewöhnliche α-β-Glucose.

Daß für die Assimilation der Fructose der Peripherie nicht die Bedeutung wie für die Verwertung der Glucose zukommt, geht aus unseren Harnuntersuchungen hervor, aus denen sich schließen läßt, daß, auch bei Berücksichtigung der *Isaac*schen Befunde, die Peripherie den relativ geringen

[1]) Vgl. dazu die Literaturzusammenstellung in der Arbeit des einen von uns (*Barrenscheen*), diese Zeitschr. **127**, 222, 1922.

[2]) Diese Zeitschr. **156**, 109, 1925.

Mengen resorbierter Fructose gegenüber nicht über den gleichen Regulationsmechanismus verfügt, wie bei viel beträchtlicheren Mengen Glucose, und daß es so zur Ausscheidung durch die Niere kommt. Auf die Phosphorsäureausscheidung durch den Harn wirkt Fructose in gleicher Weise wie Glucose. Die Ausscheidung sinkt während des Versuchs stündlich in dem gleichen Maße wie nach Glucose. Auch hier sehen wir, daß diese geringere Ausscheidung nicht durch eine Verminderung der Harnmenge vorgetäuscht wird (s. Tabelle II).

Tabelle II.

Phosphorausscheidung durch den Harn nach Fructosezufuhr.

Harnmenge in ccm Zucker P in mg	Versuch 19 vom 18. I. 1926 *Frey.* 60 g	Versuch 23 vom 30. I. 1926 *Berg.* 70 g	Versuch 29 vom 11. II. 1926 *Alb.* 100 g	Bemerkungen
ccm	35	41	25	Nüchtern
Zucker	0	0	0	Stundenwert
mg	29,5	29,3	40,9	
ccm	35	50	15	1. Stunde
Zucker	0	0	Spur	
mg	18,9	30,3	29,8	
ccm	25	68	17	2. Stunde
Zucker	Spur	0	112 mg	
mg	6,0	8,4	15,6	
ccm	45	43	20	3. Stunde
Zucker	0	0	0	
mg	10,7	6,9	9,8	
ccm	—	52	—	4. Stunde
Zucker	—	0	—	
mg	—	10,9	—	

III.

Galaktose.

Während über die Blutzuckerkurve nach Fructose eine vollkommen einheitliche Auffassung besteht, sind die für Galaktose angegebenen Befunde widersprechend. *Bang*[1]) bringt in seiner Monographie Versuche von *Leire* am Menschen, sowie vier Kaninchenversuche, aus denen eine relativ beträchtliche Steigerung auch nach geringen Mengen Galaktose hervorgeht. *Mac Lean* und *de Wesselow* finden die Galaktosekurve ähnlich der Glucosekurve, von *Folin* und *Berglund* wird dagegen ein nennenswerter Einfluß der Galaktose geleugnet und das Fehlen des Anstiegs durch die rasche Absorption durch das Gewebe gedeutet. Gleichfalls zu negativen Schlüssen kommen *Kahler* und *Machold*, die freilich nur in einem einzigen Normalfall die Blutzuckerbestimmung in kürzeren Intervallen vorgenommen haben und eine Steigerung von 120 auf 140 mg-Proz. feststellen, die sich durch längere Zeit auf dieser Höhe hält, ohne jedoch von den Autoren als Hyperglykämie gewertet zu werden. *Foster* wieder findet nach Galaktose (200 g!) eine Hyperglykämie, die an Höhe und Dauer die nach der gleichen Glucosemenge erzielte bei weitem übertritt. Zu gleichen Ergebnissen kommt *Bodansky* in seinen Tierversuchen. Wir bringen zu dieser Frage aus unserem Material fünf Versuche, in denen nur in einem (Versuch 26)

[1]) Blutzucker, Wiesbaden, Bergmann 1912.

Tabelle III.

Galaktoseversuche.

Nr.	Name und Datum	Blut	Zeit in Minuten 0	15	30	45	60	75	95	115	135	165	195	Bemerkungen
15	*Ber.* 15. XII. 1925	Zucker	95	105	99	116	102	109	89	85	91	95	87	40 g Galaktose. Ausscheidung i. Harn ∅
		Anorganischer Phosphor	3,53	3,92	3,03	3,16	3,19	3,45	3,53	3,47	3,33	3,16	3,53	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	27,3	26,4	27,8	27,6	27,3	27,5	29,8	30,0	28,8	27,3	27,3	
10	*Pop.* 30. XI. 1925	Zucker	108	139	155	170	123	119	108	99	123	110	69	40 g Galaktose
		Anorganischer Phosphor	3,87	4,28	3,57	3,55	3,57	3,87	3,73	4,28	4,11	4,62	4,62	Im Harn ausgeschieden: 9h00′— 9h30′ 1,01 g (150 ccm Harn), 9h30′—10h50′ 1,16 g (100 ccm Harn), 10h50′—15h00′ 0,1 g (170 ccm Harn)
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	32,6	31,2	32,6	32,6	32,6	31,0	32,6	34,3	31,9	31,9	32,6	
25	*Frey.* 2. II. 1926	Zucker	91	108	105	99	101	101	84	71	79	77	77	40 g Galaktose. Ausscheid. i. Harn 0,3 g
		Anorganischer Phosphor	4,73	4,73	4,46	4,32	3,79	3,70	3,66	3,56	4,13	4,13	4,13	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	22,5	22,4	22,4	22,3	24,3	24,9	24,0	26,7	22,8	24,1	26,2	
26	*Bar.* 3. II. 1926	Zucker	100	129	149	159	157	187	159	137	100	82	82	80 g Galaktose. Ausscheid. i. Harn 3,4 g
		Anorganischer Phosphor	4,36	4,46	4,25	4,32	3,96	4,00	3,94	4,09	—	3,83	3,21	
		Gesamtsäurelösl. Phosphor	30,5	27,8	30,7	30,5	30,0	30,0	30,0	29,0	—	28,3	26,5	

die dem Körpergewicht entsprechende Menge Galaktose gereicht wurde; in den anderen Fällen haben wir einheitlich 40 g gegeben (wasserfreies, reinstes *Merck*sches Präparat).

Bei den Blutzuckerkurven können wir zunächst zwei Typen unterscheiden. Der eine Typus (s. Versuch 15 und 25) zeigt einen minimalen Anstieg, dem ein langsamer Abfall auf die Norm und anschließend eine geringe Hypoglykämie folgt. Der zweite Typus zeigt weitgehende Übereinstimmung mit der Kurve des resorptiven Typs, wie wir ihn bei der Glucose aufgestellt haben. Der Anstieg ist protrahiert, erreicht relativ spät sein Maximum, der Ausgangswert wird, wenn wir in den Fällen mit 40 g die relativ geringe Zuckermenge in Betracht ziehen, verspätet erreicht. Ein Zusammenhang dieser Typen mit gewissen konstitutionellen Abweichungen können wir nicht behaupten. Gerade die Fälle, welche die Hyperglykämie ausgeprägt zeigen, repräsentieren den Normaltyp und zeigen auch im Ablauf ihrer Glucose- und Fructosekurve durchaus regelrechtes Verhalten (s. Versuche 3, 28, 18 in der vorangehenden Arbeit und Tabelle I dieser Arbeit, Versuch 6). Ob hier eine besonders günstige und rasche Resorption mit an dem Typus der Blutzuckerkurve beteiligt ist, wäre unseres Erachtens zu erwägen. Dafür spräche, daß die Fälle mit flacher Kurve relativ wenig oder gar keine Galaktose ausscheiden, während die Ausscheidung in den anderen zwischen 1,1 und 3,4 g der zugeführten Galaktose beträgt (s. Tabelle III).

Die Kurve des anorganischen Phosphors zeigt gegenüber dem bei der Glucose und Fructose beobachteten Verhalten weitgehende Abweichungen. In einem Teile der Fälle können wir den initialen Anstieg unzweideutig nachweisen, in anderen fehlt er vollkommen. Der bei den anderen Zuckerarten nun erfolgende Abfall tritt hier äußerst verspätet auf (Versuch 25) oder kommt, wie in Versuch 26, erst gegen Schluß des Versuchs deutlich zum Ausdruck. In einem anderen Versuch (15) sehen wir zu Beginn einen geringen Abfall, der jedoch nach kurzer Zeit wieder ausgeglichen ist. Die Kurve bewegt sich geradlinig annähernd auf dem Niveau des Ausgangswerts. Analoge Verhältnisse zeigt Versuch 5, bei dem die Kurve nach einem anfänglich minimalen Abfall sich schließlich dauernd über dem Ausgangsniveau hält. Der gesamtsäurelösliche Phosphor zeigt ein auffallend gleichförmiges Verhalten. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Werten übersteigen stellenweise kaum die Fehlergrenzen, der Verlauf der Kurve entspricht fast einer Geraden (s. Versuch 5) oder zeigt höchstens gegen Schluß des Versuchs die Tendenz zum Abfall. (Siehe Abb. 2.)

Versuchen wir uns an Hand der Phosphorsäurekurven ein Bild über die Assimilation der Galaktose zu machen. Wenn wir das von uns bisher beigebrachte Material vergleichend überblicken, so zeigt sich, daß die Phosphorkurve nach Galaktosezufuhr am ehesten noch der nach intravenöser Glucosezufuhr erhaltenen entspricht. Namentlich die Versuche, in denen der intravenösen Injektion eine perorale Zuckergabe folgte, sind lehrreich. Bei diesen wirkte sich die neuerliche Zuckerzufuhr nur in einem protrahierten und geringen Abfall der Phosphorkurve aus. Ebenso zeigt sich die gewisse Fixierung der organisch gebundenen Phosphorsäure. Wenn wir von dieser Analogie ausgehen, dann könnte man sich für die Assimilation der Galaktose ähnliche Verhältnisse vorstellen, wie sie durch die intravenöse Glucoseinjektion geschaffen werden. Die rasche Resorption der Galaktose — nach *Cori* liegt der Absorptionskoeffizient für Galaktose über dem der Glucose — führt, da die Leber den strukturfremden Zucker

nicht zurückzuhalten vermag, zu einer Überschwemmung der Blutbahn mit Galaktose, die sich auch in dem protrahierten Anstieg der Blutzuckerkurve manifestiert. Die Absorption durch das Gewebe erfolgt relativ rasch, die Assimilation dagegen setzt erst allmählich ein und erreicht nur geringen Umfang. Vergleichen wir die bei Fructose erhaltenen Werte mit den an derselben Versuchsperson nach Galaktosezufuhr gewonnenen, so wird

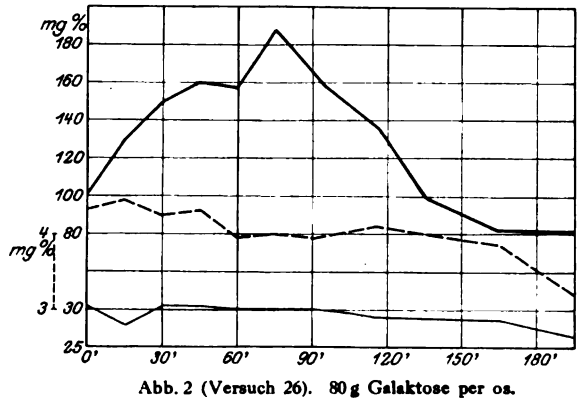


Abb. 2 (Versuch 26). 80 g Galaktose per os.
——— Blutzucker. ····· Anorg. P. ——— Gesamtsäurelösl. P.

dieser Unterschied noch deutlicher (vgl. auch Kurve 1 und 2). Trotz geringerer Resorptionsfähigkeit der Fructose finden wir als Ausdruck der Assimilation steilen Abfall der Phosphorkurve, während die weitaus günstigeren Resorptionsbedingungen der Galaktose sich in der Phosphorkurve kaum geltend machen. Haben wir für die Fructose aus diesem Verhalten den Schluß gezogen, daß sie durch ihren strukturellen Aufbau dem Organismus für die Assimilation die günstigsten Bedingungen liefert, so können wir für die Galaktose umgekehrt folgern, daß sie durch ihre Struktur für den Organismus nur schwer angreifbar ist und ihre Umlagerung in die körpereigene Form nur allmählich erfolgen kann[1]). In diesem Sinne sprechen auch unsere Befunde über die Phosphorausscheidung im Harn nach Galaktose (s. Tabelle IV).

Der nach Glucose und Fructose feststellbare Abfall der Phosphorausscheidung ist in den Galaktoseversuchen nur wenig ausgeprägt oder fehlt vollständig. Hervorheben möchten wir noch, daß das Maximum der Zuckerausscheidung in die zweite Hälfte des Versuchs fällt, in eine Zeit, zu welcher die Zuckerkurve ihr Maximum längst überschritten hat. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß, analog den von *Isaac* für die Fructose festgestellten Verhältnissen, die Galaktose auch bei normalen Blutzuckerwerten zu einem relativ hohen Prozentsatz an den Reduktionswerten beteiligt ist.

---

[1]) Vgl. dazu auch die Befunde von *Moschini* (ref. Kongr. Zentralbl. f. inn. Med. **40**, 49), nach denen Fructose per os beim Kaninchen den Insulinerscheinungen noch rascher als Glucose entgegenwirkt, während Galaktose diese viel langsamer beeinflußt.

Tabelle IV.

Phosphorausscheidung durch den Harn nach Galaktosezufuhr.

Harn: Menge in ccm Zucker mg P	Versuch 15 vom 15. XII. *Berg.* 40 g	Versuch 25 vom 2. XII. *Frey.* 40 g	Versuch 26 vom 3. II. *Bar.* 80 g	Bemerkungen
ccm	43	24	68	Nüchtern Stundenwert
Zucker	—	—	—	
mg	26,8	21,9	38,7	
ccm	51	47	48	1. Stunde
Zucker	—	0,1	0,57	
mg	14,6	24,7	28,2	
ccm	41	143	98	2. Stunde
Zucker	—	0,2	1,3	
mg	18,3	20,8	33,7	
ccm	65	111	70	3. Stunde
Zucker	—	0,01	1,46	
mg	14	14,5	33,5	
ccm	40	49	37	4. Stunde
Zucker	—	0	0,06	
mg	20,7	24,7	27,7	

Zusammenfassung.

1. Die Blutzuckersteigerung nach Fructosezufuhr bleibt hinter der nach äquivalenten Mengen Glucose beobachteten erheblich zurück. Die Kurve der anorganischen Phosphorsäure zeigt einen beträchtlichen, lang andauernden Abfall, der für eine besonders intensive Assimilation spricht. Die Ausscheidung der Phosphorsäure durch den Harn verhält sich gleich der bei Glucosezufuhr beobachteten, während der Assimilation spart der Organismus Phosphat ein.

2. Nach Galaktosezufuhr kommt es im überwiegenden Teil der Fälle zu einer beträchtlichen Hyperglykämie, ohne daß konstitutionelle Minderwertigkeit oder eine Insuffizienz der Kohlehydratassimilation dafür verantwortlich gemacht werden könnte. Die Wirkung der Galaktose auf den anorganischen Phosphor ist nur wenig ausgeprägt, die Kurve zeigt in ihrer Form weitgehend Ähnlichkeit mit der nach intravenöser Glucosezufuhr beobachteten. Die Phosphorausscheidung durch den Harn wird durch Galaktosezufuhr nicht wesentlich beeinflußt. Legt man die Phosphorkurve der Beurteilung über die Verwertbarkeit der einzelnen Zuckerarten zugrunde, so zeigt sich, daß von den untersuchten Zuckern unter Berücksichtigung der Resorptionsgeschwindigkeit Fructose am raschesten, Galaktose am schlechtesten assimiliert werden kann.

Beiträge zum Problem des Blutzuckers.

VI. Mitteilung:
Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 4. Diabetes.

Von

H. K. Barrenscheen, Friedrich Dolleschall und Ludwig Popper.

(Aus dem Institut für medizinische Chemie in Wien.)

(Eingegangen am 23. Juli 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I.

Zur Frage der Bedeutung der Phosphorkurve für die Assimilation zugeführten Zuckers versprach eine Untersuchung des Diabetes wesentliche Aufschlüsse. Ist die diabetische Stoffwechselstörung, wie zuerst *Minkowski* angenommen hat, durch eine mangelhafte Verwertbarkeit des Zuckers bedingt, so mußte sich in der Phosphorkurve ein prinzipieller Unterschied gegen den Normalen ergeben. Beim Diabetiker und beim Hunde nach Pankreasexstirpation haben *Bolliger* und *Hartman*[1]) einzelne Versuche mit intravenöser Glucoseinjektion unternommen mit dem Ergebnis, daß der Abfall der anorganischen Phosphorsäure gegen den Verlauf der Kurve beim Normalen bedeutend flacher und protrahiert ist.

Wir hatten Gelegenheit, mit unserer Methodik vier Fälle zu untersuchen[2]). Für die Beurteilung der Frage sind die Fälle besonders geeignet, da bei ihnen vorher mit Ausnahme des einen (Versuch 45) keinerlei Behandlung der diabetischen Stoffwechselstörung stattgefunden hat. Wenn wir die Fälle nach der Schwere des klinischen Krankheitsbildes gruppieren, so müssen wir Versuch 36 besonders herausheben.

Es handelt sich hier um einen 45jährigen Beamten, der wegen der Beschwerden einer Pankreatitis die Klinik aufsuchte und bei dem die Glykosurie als Zufallsbefund festgestellt wurde. Die Zusammenstellung des

---

[1]) Journ. of biol. Chem. **64**, 91, 1925.

[2]) Herrn Assistent Dr. *Gottfried Holler* der II. medizinischen Universitäts-Klinik danken wir auch an dieser Stelle für die Überweisung der Fälle.

Versuchs (s. Tabelle I) ergibt eine Übersicht über den Verlauf. An der Blutzuckerkurve fällt der auffallend protrahierte Anstieg und der ebenso protrahierte Abfall auf, der jedoch am Schluß des Versuchs mit einer geringen alimentären Hypoglykämie endet. Die Kurve des anorganischen Phosphors zeigt in ihrem Anfangsteil keinen ausgesprochenen Abfall, ist im Gegenteil durch eine beträchtliche kurzdauernde Steigerung unterbrochen, die bemerkenswerterweise mit einer Steigerung des gesamtsäurelöslichen Phosphors einhergeht. Schließlich setzt ein protrahierter Abfall ein, der jedoch weder absolut noch prozentisch die Werte erreicht, die wir sonst nach Glucosezufuhr zu sehen gewohnt sind. Die Kurve des gesamtsäurelöslichen Phosphors zeigt ein Auf- und Abschwanken, die Anstiege gehen mit den Erhebungen der anorganischen Fraktion parallel. Ein ganz eigenartiges Bild ergibt die Phosphorausscheidung durch den Harn (siehe Tabelle II). Im Gegensatz zu der beim Normalen feststellbaren Phosphatretention wird hier im Anschluß an die Glucosezufuhr Phosphorsäure vermehrt ausgeschieden, und zwar läßt sich ein gewisser Parallelismus zwischen der Höhe der Phosphorausscheidung und der auftretenden alimentären Glykosurie feststellen. Die Glykosurie erreicht in der zweiten Stunde nach Zuckerzufuhr ihr Maximum, zur selben Zeit, in der auch die Phosphorausscheidung durch den Harn den höchsten Wert ergibt. Die Assimilation scheint in diesem Falle, wie die Phosphor- und Zuckerkurve ergeben, bereits weitgehend gestört zu sein.

Haben wir es hier mit einem Grenzfall zu tun, bei dem man zwischen der Diagnose des Diabetes levis und einer durch die Pankreatitis bedingten Insuffizienz des Inselapparats schwanken kann, so zeigt Versuch 44 bereits ein wesentlich anderes Bild. Es handelt sich um einen 46jährigen Schuhmacher, bei dem die Glykosurie angeblich vor 15 Jahren zum ersten Male festgestellt wurde und der an beträchtlicher Adipositas leidet. Hier steigt der Blutzucker von einem bereits hyperglykämischen Nüchternwert langsam zu dem beträchtlichen Wert von 281 mg-Proz. und erreicht erst nach 195 Minuten die Norm. Die Kurve der anorganischen Phosphorsäure verläuft fast geradlinig und läßt höchstens in den letzten drei Werten einen minimalen Abfall erkennen. Der gesamtsäurelösliche Phosphor zeigt wieder das eigentümlich oszillierende Verhalten, ohne jedoch zur Kurve des anorganischen Phosphors nähere Beziehung erkennen zu lassen. Die Zuckerausscheidung durch den Harn beträgt über 8 g, das Maximum der Glykosurie liegt auch hier in der zweiten Stunde nach der Zuckerzufuhr. Die Phosphorausscheidung ist anfangs vermehrt und fällt erst in der dritten und vierten Stunde langsam ab. Im klinischen Bilde ist die diabetische Stoffwechselstörung in diesem Falle wenig ausgeprägt, gibt sich aber in der Phosphor- und Blutzuckerkurve deutlich zu erkennen (s. Abb. 1).

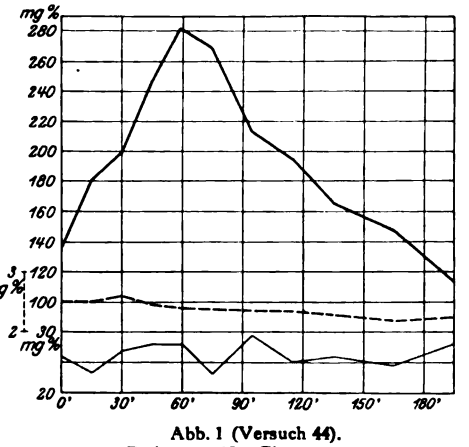


Abb. 1 (Versuch 44).
Diabetes. 95 g Glucose per os.
——— Blutzucker. -------- Anorg. P.
——— Gesamtsäurelösl. P.

Tabelle I. Diabetiker.

Nr.	Datum 1926	Name	Blut	Zeit in Minuten 0	15	30	45	60	75	95	115	135	165	195
36	19. III.	*Züg.* 70 g Glucose per os	Zucker	114	157	188	199	208	180	159	123	108	97	85
			anorg. P	2,39	2,50	2,38	3,46	2,06	2,21	1,96	1,96	2,44	2,22	2,26
			gesamtsäurel. P	29,0	31,1	28,0	31,7	28,0	31,9	30,7	26,8	30,0	31,1	25,6
44	12. VI.	*Diam.* 95 g Glucose per os	Zucker	137	181	198	246	281	269	213	194	165	148	113
			anorg. P	2,51	2,49	2,62	2,45	2,41	2,39	2,36	2,36	2,28	2,22	2,24
			gesamtsäurel. P	25,9	23,4	26,8	27,9	27,8	23,3	29,4	25,0	26,0	24,5	27,9
45	24. VI.	*Roz.* 60 g Glucose per os	Zucker	261	338	392	437[1]	454[2]	471[3]	513[4]	486[5]	462[6]	419[7]	—
			anorg. P	3,84	3,78	3,98	—	3,33	3,50	3,81	3,56	3,10	4,01	—
			gesamtsäurel. P	26,1	27,3	26,5	—	25,7	25,0	26,5	26,8	25,0	28,9	—
34	12. III.	*Czer.* 60 g Glucose per os	Zucker	399	445	449	465	492	481	511	486	452	448	421
			anorg. P	5,31	4,81	5,00	5,00	4,83	5,10	5,02	5,00	4,85	4,44	3,95
			gesamtsäurel. P	25,3	21,3	24,9	31,9	32,4	32,4	34,7	23,2	23,4	22,8	23,1

[1]) Entnahme nach 50 Minuten. — [2]) Entnahme nach 70 Minuten. — [3]) Entnahme nach 85 Minuten. — [4]) Entnahme nach 105 Minuten. — [5]) Entnahme nach 125 Minuten. — [6]) Entnahme nach 145 Minuten. — [7]) Entnahme nach 175 Minuten.

Tabelle II. Phosphorausscheidung durch den Harn nach Glucosezufuhr bei Diabetikern.

	Versuch 36 19. III. 1926 *Züg.*	Versuch 44 12. VI. 1926 *Diam.*	Versuch 45 24. VI. 1926 *Roz.*	Versuch 34 12. III. 1926 *Czern.*	Bemerkungen		Versuch 36 19. III. 1926 *Züg.*	Versuch 44 12. VI. 1926 *Diam.*	Versuch 45 24. VI. 1926 *Roz.*	Versuch 34 12. III. 1926 *Czern.*	Bemerkungen
ccm	34	31	18	65	Nüchtern-Stunden-wert	ccm	38	70	105	197	3. Stunde
Zucker . g	0	0	0,12	2,99		Zucker . g	0,11	2,38	6,61	12,40	
mg	19	34,4	10,5	11,5		mg	26,1	24,8	32,8	23,5	
ccm	68	52	24	161	1. Stunde	ccm	—	31	—	—	4. Stunde
Zucker . g	1,22	0,78	0,57	7,84		Zucker . g	—	Spur	—	—	
mg	29	44	18,3	23,5		mg	—	16,4	—	—	
ccm	100	104	116	191	2. Stunde						
Zucker . g	2,5	4,9	6,61	11,02							
mg	32,2	35,1	37,2	19,1							

Ein ausgesprochen diabetisches Krankheitsbild zeigt dagegen Versuch 45, eine 62jährige Offizierswitwe, bei der der Diabetes vor 16 Jahren konstatiert wurde und die über diabetische Beschwerden (Furunkulose, Hautjucken, Mattigkeit, Gewichtsverlust) klagt. Der Fall, der jahrelang in diätetischer Behandlung stand — Insulin wurde bisher nicht angewendet —, zeigt den hohen Nüchternwert von 261 mg-Proz., dem die relativ geringe Zuckerausscheidung von 0,7 Proz. gegenübersteht. Auf die Zufuhr von 65 g Glucose reagiert nun der Blutzucker mit der enormen Steigerung auf 513 mg-Proz. Der Anstieg ist auffallend langsam, ebenso langsam fällt die Kurve ab und ist nach 175 Minuten noch immer auf dem Werte von 419 mg-Proz. Die Kurve der anorganischen Phosphorsäure verläuft anfangs fast gerade, zeigt dann einen minimalen Abfall, um schließlich mit einem Werte über dem Ausgangswert zu enden. In der Kurve des gesamtsäurelöslichen Phosphors ist eine auffallende Gleichförmigkeit festzustellen, nur der letzte Wert erhebt sich beträchtlich über das Ausgangsniveau. Die Phosphorsäureausscheidung durch den Harn zeigt, wie auch im Versuch 36, einen ständigen Anstieg. Die Zuckerausscheidung nimmt namentlich in der zweiten Stunde nach der Zuckerzufuhr beträchtlich zu. Auch hier sehen wir gegenüber der Reaktion des Normalen in der minimalen Senkung der Phosphorsäurekurve den Ausdruck für die herabgesetzte Assimilationsfähigkeit.

Dem Altersdiabetes mit bereits beträchtlich verminderter Assimilationsfähigkeit stellen wir im Versuch 34 einen jugendlichen, unbehandelten Diabetes gegenüber. Bei der 27jährigen Hausgehilfin zeigten sich seit etwa einem halben Jahre ausgesprochen diabetische Symptome (Durst, Polyurie, Abnahme des Körpergewichts). Irgendwelche Behandlung hatte noch nicht stattgefunden. Die Blutzuckerkurve zeigt in diesem Falle das für den Diabetes wiederholt beschriebene charakteristische Verhalten: enorm protrahierter Anstieg und langsamer Abfall, ohne nach 3 Stunden den Ausgangswert zu erreichen. Das Gegenstück dazu ist die Kurve des anorganischen Phosphors, der sich anfangs fast auf einer Geraden hält und erst mit dem letzten Wert einen Abfall zeigt. Im Harn können wir das auch sonst von uns beobachtete Verhalten feststellen. Die Glucosezufuhr bedingt eine vermehrte Ausschwemmung von Phosphorsäure, die Zuckerausscheidung steigt von Stunde zu Stunde langsam an.

Fassen wir das allen Fällen Gemeinsame zusammen, so finden wir, von dem bereits hinlänglich beschriebenen typischen Verlauf der Blutzuckerkurve abgesehen, überall beim anorganischen Phosphor, dessen Kurve wir als Kriterium der Assimilation betrachten, als wesentliches Kennzeichen den kaum angedeuteten, äußerst protrahierten Abfall. Damit Hand in Hand geht das Fehlen des beim Normalen typischen initialen Anstiegs: die normale Reizwirkung fehlt. Die Kurve bleibt vielmehr nach der Glucosezufuhr entweder auf dem gleichen Niveau oder zeigt einen minimalen Abfall. Sie ist der ins Pathologische gesteigerte Resorptionstyp (s. Abb. 1).

Eine gesonderte Betrachtung verdient das Verhalten der Phosphorausscheidung durch den Harn. Die Umkehrung der beim Normalen physiologischen Retention in eine vermehrte Ausschwemmung beim Diabetiker, veranlaßt um so mehr zu theoretischen Überlegungen, als wir durch die Untersuchungen von *Elias* und *Weiss*[1]) wissen, daß Phosphat-

[1]) Wien. Arch. f. klin. Med. 4, 29, 1922.

injektionen beim Diabetiker im Gegensatz zum Normalen den Blutzucker herabsetzt und auch die Zuckerausscheidung durch den Harn günstig beeinflußt. Wir möchten in dem von uns festgestellten Verhalten des Diabetikers eine Stütze für die Annahme von *Elias* sehen, daß die Wirkung der Phosphatinjektion möglicherweise auf der Bildung von Kohlehydrat-Phosphorsäurekomplexen beruht. Es würde so gewissermaßen durch die Verschiebung in der Menge verfügbaren Phosphats die sonst ungenügende Phosphorylierung erzwungen werden. Eine Erklärung für die vermehrte Phosphorsäureausscheidung nach Zuckerzufuhr ist schwer zu geben. Man könnte daran denken, daß der Organismus des Diabetikers die Phosphorylierung nur unvollkommen durchführen kann und daß es dann in der Niere — entsprechend den von *György*[1]) geäußerten Ansichten über die Rolle der Niere im Phosphatstoffwechsel — zu einer Aufspaltung dieser abwegigen Phosphorsäureverbindungen und damit zu einer vermehrten Glykosurie und Phosphorsäureausscheidung kommt. Vielleicht läßt sich damit das Verhalten der gesamtsäurelöslichen Phosphorsäure, wie wir es im Versuch 36 besonders deutlich vor Augen sehen und wie es auch Versuch 34 zeigt, in Einklang bringen.

Zusammenfassung.

1. Im Gegensatz zum Normalen zeigt die Kurve des anorganischen Phosphors beim Diabetiker nach Glucosezufuhr nur einen minimalen protrahierten Abfall.

2. Auf Glucosezufuhr antwortet der Diabetiker mit einer vermehrten Phosphorsäureausscheidung durch den Harn.

---

[1]) Diese Zeitschr. **169**, 157, 1925.

Beiträge zum Problem des Blutzuckers.

VII. Mitteilung:
Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 5. Insulin.

Von

H. K. Barrenscheen und **Robert Berger.**

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 23. Juli 1926.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I.

Der Einfluß, den Insulin neben seiner Wirkung auf den Blutzucker auch auf die anorganische Phosphorsäure des Blutes übt, ist schon mehrfach Gegenstand der Untersuchung gewesen.

Wir verweisen auf die von uns bereits in den vorstehenden Mitteilungen erwähnten Arbeiten von *Harrop* und *Benedict*, *Staub*, *Günther* und *Fröhlich*, *Blatherwick*, *Bell* und *Hill*, *Bolliger* und *Hartman*, ferner *Briggs*, *Köchig*, *Doisy* und *Weber*[1]). Übereinstimmend wird die Senkung der anorganischen Phosphorsäure hervorgehoben. Mit der gesamtsäurelöslichen Fraktion beschäftigten sich nur *Briggs* und seine Mitarbeiter, welche drei Versuche an Hunden mitteilen, in denen sie je einmal vor und nach Insulininjektion den anorganischen und gesamtsäurelöslichen Phosphor im Vollblut bzw. Plasma untersuchten. Angaben über die Zeiten und die Insulindosen gehen aus der Arbeit nicht hervor. Während die Werte für den anorganischen Phosphor die typische Senkung zeigten, blieb im Vollblut die gesamtsäurelösliche Phosphorsäure konstant. Mit der Rolle, welche das Insulin im Kohlehydrat-Phosphorsäurestoffwechsel spielt, beschäftigen sich ausführlich die Arbeiten von *Brugsch*[2]) und seinen Mitarbeitern, welche in einer großen Reihe von experimentellen Untersuchungen an Leber und Muskelgewebe zu dem Ergebnis kamen, daß das Insulin für die Phosphorylierung wesentlich sei und seiner Natur nach den Cofermenten zugezählt werden müsse. Zu

[1]) Journ. of biol. Chem. 58, 721, 1924.
[2]) Diese Zeitschr. 147 u. ff.

ähnlichen Schlüssen kommen auch *Greenwald*, *Gross* und *Samet*[1]), die rein theoretisch dem Insulin die Rolle einer Phosphatese zuschreiben.

Wir haben im Anschluß an unsere bisher mitgeteilten Untersuchungen über Blutzucker und Phosphorsäurekurve auch dieser Frage, die theoretisch von weittragendster Bedeutung ist, unser Augenmerk zugewendet und bringen im nachstehenden die Ergebnisse unserer Untersuchungen.

II.

Die Versuche wurden in Selbstversuchen und an zwei normalen, stoffwechselgesunden Kollegen ausgeführt, die wir wiederholt im Laufe der vorstehenden Untersuchungsreihe zu untersuchen Gelegenheit hatten. Das verwendete Insulin war dänisches Insulin „Leo", von dem 20 und in einem Versuch 40 Einheiten subkutan injiziert wurden. Zwei Versuche wurden als Nüchternversuche durchgeführt, in zwei anderen wurden 65 bzw. 80 g Glucose eine halbe Stunde nach der Injektion gegeben. Betrachten wir zunächst die Versuche am Nüchternen.

In Versuch 46 haben wir, um eventuell die von *Müller* und *Petersen*[2]) behauptete primäre blutzuckersteigernde Wirkung des Insulins feststellen zu können, die Entnahme während der ersten Stunde in Abständen von 5 bzw. 10 Minuten durchgeführt. Eine Steigerung des Blutzuckers konnten wir nicht feststellen. Während der ersten 30 Minuten bleibt der Blutzuckerwert nahezu konstant. Nach 40 Minuten beginnt ein allmählicher Abfall, der nach 150 Minuten sein Minimum mit 68 mg-Proz. erreicht (s. Tabelle I).

Tabelle I.

Versuch 46, *Pop.*, 22 Jahre, Mediziner. 20 Einheiten Insulin „Leo" subkutan. Nüchternversuch.

Zeit	Blut			Harn		Bemerkungen
	Zucker	Anorganischer P	Gesamtsäurelöslicher P	Menge ccm	Anorganischer P	
8h30′	107	2,65	23,8	—	—	Nüchternwert
8 40	—	—	—	—	—	Injektion
8 45	109	2,76	26,5	—	—	
8 50	109	3,35	26,5	—	—	
8 55	109	2,74	25,6	—	—	
9 00	109	2,64	24,0	—	—	
9 10	105	3,75	27,1	—	—	
9 20	92	3,07	28,0	—	—	Schweißausbruch, Tremor
9 30	86	2,57	26,3	—	—	
9 40	79	2,60	26,3	—	—	
10 00	78	2,58	26,3	—	—	Blässe
10 20	85	2,61	26,3	—	—	
10 40	75	2,33	25,1	—	—	Hungergefühl, Somnolenz
11 10	68	2,60	26,6	—	—	
11 40	75	2,72	27,9	—	—	

[1]) Journ. of biol. Chem. **62**, 401, 1924/25.
[2]) Münch. med. Wochenschr. 1926, Nr. 18, S. 726.

Bezeichnenderweise traten bereits nach 40 Minuten bei einem Blutzucker von 92 mg-Proz. die Erscheinungen sogenannter Hypoglykämie auf, die sich weiterhin zu enormem Schweißausbruch, Tremor, Blässe und einem fast unerträglichen Hungergefühl steigerten. In der Kurve des anorganischen Phosphors sehen wir an Stelle des erwarteten Abfalls zunächst eine Steigerung, die zwei Zacken nach 10 und 30 Minuten aufweist. Sonst hält sich der Phosphorwert während des ganzen Versuchs annähernd auf gleicher Höhe. Von einer nennenswerten Senkung, die mit der Blutzuckerkurve parallel gehen sollte, ist absolut keine Rede. Der gesamtsäurelösliche Phosphor zeigt an der Stelle, an der auch die höchste Erhebung des anorganischen Phosphors ist, eine deutlich ausgeprägte Steigerung, verläuft im übrigen vollkommen flach und zeigt erst im letzten Wert einen geringfügigen Anstieg (s. Abb. 1).

Zu fast identischen Ergebnissen führt Versuch 48. In der ersten Viertelstunde nach der Injektion sehen wir den Blutzucker vom

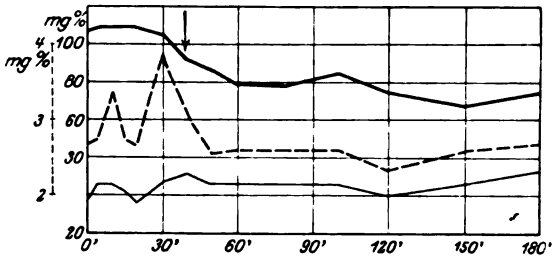


Abb. 1 (Versuch 46).
20 Einheiten Insulin „Leo" subkutan.
——— Blutzucker. ····· Anorg. P. ——— Gesamtsäurelösl. P.
Bei ↓ hypoglykämische Erscheinungen.

Ausgangswert 109 auf 112 mg gestiegen, doch möchten wir einer so geringfügigen Steigerung keine Bedeutung beimessen. Dann folgt ein allmählicher Abfall, der nach 90 Minuten mit einem Werte von 70 mg-Proz. sein Maximum erreicht. Irgendwelche Erscheinungen von „Hypoglykämie" traten hier nicht auf. Die Kurve der anorganischen Phosphorsäure zeigt in der ersten Stunde einen geringfügigen Abfall, der dann durch einen Anstieg unterbrochen wird. Der weitere Verlauf der Kurve ist ein vollkommen flacher. Eine nennenswerte Senkung gegen den Ausgangswert besteht nicht. Ganz unregelmäßig verhält sich die Kurve des gesamtsäurelöslichen Phosphors, bei der bald Steigerung, bald geringe Senkung auftritt, ohne daß sich für uns eine derzeit irgendwie erkennbare Beziehung zum anorganischen Phosphor oder zur Blutzuckerkurve herstellen ließe. Deutlicher erkennbar ist der Einfluß des Insulins auf die Phosphorausscheidung durch den Harn. Die stündlich entleerten Harnportionen zeigen ein beträchtliches Absinken der Phosphorausscheidung, wie wir es sonst nach Glucose- oder Fructosezufuhr feststellen konnten.

Tabelle II.

Versuch 48, *Bar.*, 38 Jahre, 20 Einheiten Insulin „Leo" subkutan. Nüchternversuch.

Zeit	Blut			Harn		Bemerkungen
	Zucker	Anorganischer P	Gesamtsäure-löslicher P	Menge ccm	Anorg. P mg	
8h15′	109	3,59	29,8	—	—	Nüchternwert
8 20	—	—	—	51	15,1	
8 25	—	—	—	—	—	Injektion
8 40	112	3,53	29,4	—	—	
8 55	101	3,42	28,3	—	—	
9 10	101	3,11	26,5	—	—	
9 20	—	—	—	33	9,0	
9 25	98	3,02	29,0	—	—	
9 40	90	3,28	26,8	—	—	
9 55	70	4,06	28,8	—	—	
10 15	81	3,30	27,5	—	—	
10 20	—	—	—	35	5,0	
10 35	83	3,40	27,5	—	—	
11 05	85	3,42	27,8	—	—	
11 15	—	—	—	26	6,0	
11 35	80	3,33	29,0	—	—	

In den Versuchen mit Glucosezufuhr erhielt Fall 49 20 Einheiten Insulin und nach 30 Minuten 65 g Glucose, entsprechend 1 g pro Kilogramm Körpergewicht. 20 Minuten nach Injektion des Insulins finden wir hier im Blutzucker eine Steigerung von 92 auf 101 mg-Proz., die, außerhalb der Fehlergrenze liegend, für die Richtigkeit der von *Müller* und *Petersen* geäußerten Anschauungen zu sprechen scheint. Die jetzt folgende Glucose-

Tabelle III.

Versuch 49, *Dol.*, 30 Jahre, Arzt. 20 Einheiten Insulin „Leo" subkutan. 30 Minuten nach der Injektion, 65 g Glucose = 1 g pro Kilogramm Körpergewicht.

Zeit	Blut			Harn		Bemerkungen
	Zucker	Anorganischer P	Gesamtsäure-löslicher P	Menge ccm	Anorg. P. mg	
8h10′	94	4,97	25,3	—	—	Nüchternwert
8 15	—	—	—	—	—	20 Einheiten
8 35	101	4,43	25,4	—	—	
8 45	—	—	—	—	—	65 g Glukose per os
9 00	135	4,09	25,3	—	—	
9 15	132	3,91	25,3	—	—	
9 30	140	3,72	24,9	—	—	
9 45	115	4,00	25,6	—	—	
10 00	107	4,43	25,3	—	—	
10 30	76	4,00	25,3	—	—	
10 50	—	—	—	—	—	Schweißausbruch, Tremor, Schwächegefühl, Blässe, Puls 60
11 00	78	3,54	25,5	—	—	
11 30	76	3,56	25,6	—	—	
12 00	71	3,83	25,3	—	—	

zufuhr bedingt eine Hyperglykämie, die sich nicht wesentlich in Höhe und Dauer des Anstiegs von der mit der gleichen Glucosemenge ohne Insulin erreichten unterscheidet (vgl. die IV. Mitteilung dieser Reihe, Versuch 18, Tabelle I). Die Blutzuckerkurve, die nach 75 Minuten den Ausgangswert erreicht, zeigt dann einen rapiden Abfall, der 225 Minuten nach der Injektion mit 71 mg-Proz. seinen Tiefpunkt erreicht hat (s. Tabelle III).

Gleichzeitig mit dem Abfall auf 76 mg-Proz. traten hier die ersten „hypoglykämischen" Erscheinungen auf: Schweißausbruch, Schwächegefühl, Tremor, ausgesprochener Vaguspuls, die sich weiter steigerten, gegen Ende des Versuchs jedoch von selbst abklangen. Die Kurve des anorganischen Phosphors läßt in ihrem Anfangsteil einen deutlichen Abfall erkennen, der auch hier wieder durch einen Anstieg unterbrochen wird, dem ein neuerlicher Abfall mit flachem Verlauf der Kurve folgt. Ganz charakteristisch ist die Kurve für den gesamtsäurelöslichen Phosphor, die als vollkommene Gerade ohne die geringsten Schwankungen nach oben oder unten verläuft (s. Abb. 2).

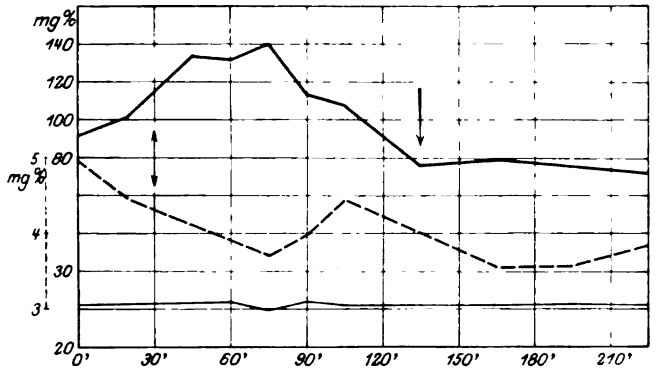


Abb. 2 (Versuch 49).
20 Einheiten Insulin „Leo" subkutan.
——— Blutzucker. ····· Anorg. P. ——— Gesamtsäurelösl. P.
Bei ↕ 65 g Glucose per os. Bei ↓ hypoglykämische Erscheinungen.

Analoge Verhältnisse finden wir im Versuch 47, bei dem 40 Einheiten Insulin injiziert wurden. Die Blutzuckerkurve zeigt anfänglich einen geringen Abfall, der auch 15 Minuten nach der Glucosegabe von 80 g noch in Erscheinung tritt, dann kommt es unter dem Einfluß der Glucose zu einer minimalen Steigerung. Im Typus ihres Ablaufs zeigt diese Hyperglykämiekurve ebenso wie im vorangehenden Versuch keine wesentlichen Differenzen gegenüber der ohne Insulin erhaltenen (s. IV. Mitteilung, Versuch 8, Tabelle I). Es hat nur den Anschein, als ob durch das Insulin die Höhe des Anstiegs etwas herabgedrückt würde, der übrige individuell charakteristische Verlauf wird jedoch in keiner Weise berührt. In der Kurve des anorganischen Phosphors sehen wir unmittelbar nach Insulin einen Abfall, der auf die Glucosezufuhr durch einen geringen Anstieg unterbrochen wird, den wir als den gewohnten initialen Anstieg nach Glucose deuten möchten. Der weitere Verlauf stimmt mit dem in Versuch 49 beschriebenen vollkommen überein. Ebenso zeigt die Kurve des gesamtsäurelöslichen Phosphors den geradlinigen Verlauf (s. Tabelle IV).

Tabelle IV.

Versuch 47, *Ber.*, 22 Jahre, Mediziner. 40 Einheiten Insulin „Leo", nach 30 Minuten 80 g Glucose.

Zeit	Blut			Harn		Bemerkungen
	Zucker	Anorganischer P	Gesamtsäurelöslicher P	Menge ccm	Anorg. P. mg	
8h20'	108	3,94	28,1	18	34,6	Nüchternwert. Harn. Stundenportion
8 25	—	—	—	—	—	40 Einheiten subkutan
8 45	101	3,21	27,8	—	—	
8 55	—	—	—	—	—	80 g Glucose
9 10	93	3,52	27,9	—	—	
9 20	—	—	—	16	22,1	
9 25	108	3,10	28,1	—	—	
9 40	110	3,04	28,2	—	—	
9 55	113	3,04	27,9	—	—	
10 10	98	3,31	27,4	—	—	
10 20	—	—	—	15	12,9	
10 25	103	3,19	26,4	—	—	
10 45	102	2,52	26,6	—	—	
11 05	102	2,49	27,8	—	—	Schweißausbruch, Tremor, Schwächegefühl, ausgesprochener Vaguspuls
11 20	—	—	—	18	11,8	
11 35	88	2,45	27,8	—	—	Heißhunger
12 05	80	2,30	26,5	—	—	
12 20	—	—	—	31	8,6	

Bemerkenswert ist hier, daß wir 140 Minuten nach Beginn des Versuchs bei einem Blutzucker von 102 mg-Proz. einen ausgeprägten hypoglykämischen Anfall erlebten, der so bedrohlich aussah, daß wir uns schon zum Abbruch des Versuchs entschließen wollten. Die Untersuchung der Phosphorausscheidung durch den Harn zeigte in diesem Falle die schon von den Glucoseversuchen bekannte Retention von Phosphorsäure, eine durch die Injektion vermehrte Retention ließ sich nicht feststellen.

Überblicken wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen, so fällt zunächst bei den Versuchen, in denen es zu „hypoglykämischen" Symptomen kam, der auffallend hohe Blutzuckerwert auf, bei dem diese Erscheinungen schon zutage traten (92 bzw. 76 bzw. 102 mg-Proz.). Wir glauben, daß dies nur in dem Sinne der heute immer mehr angenommenen Meinung zu werten ist, daß die Blutzuckersenkung als solche an diesen Erscheinungen der Insulinvergiftung nicht beteiligt ist. Konnten wir doch in unseren früheren Versuchen eine alimentäre Hypoglykämie auch bei denselben Versuchspersonen beobachten, die bei weit niedrigeren Werten nicht die geringsten unangenehmen Empfindungen auslöste. Für die Frage der Insulinwirkung scheint es uns wesentlich, auf diesen Punkt ganz besonders hinzuweisen.

In den Nüchternversuchen ist die auffallend geringe Wirkung des Insulins auf die Phosphorkurve bei ausgeprägter Wirkung auf den Blutzucker besonders auffallend. Wir möchten das so erklären, daß hier für das Insulin gewissermaßen das Substrat fehlt. Ist das Insulin, wie es *Brugsch* formuliert, unter anderem auch das Coferment der Phosphatese, dann kann es beim nüchternen Normalen seine Wirkung nicht in dem Maße

entfalten, wie beim Diabetiker, bei dem die Wirkung auf die Phosphorkurve eine viel ausgeprägtere ist. Es würde dieser negative Ausfall unserer Versuche ein indirekter Beweis dafür sein, daß der Blutzucker beim Normalen anders konfiguriert als der beim Diabetiker kreisende. Die im Verlauf der Kurve des anorganischen Phosphors beobachteten Steigerungen, die bereits *Blatherwick*, *Bell* und *Hill* aufgefallen waren, können wir bei dem heutigen Stand unserer Erkenntnis nicht befriedigend erklären. In Anlehnung an die Anschauung von *Müller* und *Petersen* könnte an eine Mobilisierung gedacht werden, wofür vielleicht im Versuch 46 die mit der Steigerung parallel gehende Erhebung des gesamtsäurelöslichen Phosphors spricht. Es wäre so die Steigerung des anorganischen Phosphors gewissermaßen ein Äquivalent für die Blutzuckersteigerung. Auf das Verhalten der Phosphorausscheidung im Harn wollen wir im weiteren Zusammenhang noch zurückkommen und hier nur kurz auf unsere Versuche mit gleichzeitiger Darreichung von Glucose eingehen. Im wesentlichen bringen sie eine Bestätigung der bereits vorliegenden Resultate. Auch hier finden wir die Kurve des anorganischen Phosphors durch einen Anstieg unterbrochen, ohne dafür eine Erklärung geben zu können. Von dem nach peroraler Glucosezufuhr erhaltenen Typus weichen diese Kurven jedoch weitgehend ab. Eine Beschleunigung des normalen Ablaufs ist nicht zu erkennen. Vielleicht war die injizierte Insulinmenge zu groß, jedenfalls möchten wir aus unseren Ergebnissen den Schluß ziehen, daß Versuche am Normalen in dieser Anordnung nicht geeignet sind, uns über die Physiologie des Insulins wesentlichen Aufschluß zu geben. Auch hier dürfte der Pathologie die Rolle des Lehrmeisters der Physiologie zukommen.

Viel bedeutungsvoller erscheint uns jedoch das eigenartige Verhalten des gesamtsäurelöslichen Phosphors, dessen Wert sich im Gegensatz zu unseren Erfahrungen nach Darreichung von Glucose allein praktisch nicht ändert. Während wir die nach Glucosezufuhr beobachteten Steigerungen des gesamtsäurelöslichen Phosphors, die besonders schön im Vergleich des arteriellen und venösen Blutes zutage traten, als Ausdruck eines Transports deuteten, fehlt in den Insulinversuchen jegliche Schwankung. Es hat den Anschein, als ob unter der Wirkung des Insulins eine Fixation der gebildeten Phosphorsäurekomplexe im Gewebe Platz greifen würde. Eine solche Annahme gewinnt durch die schönen Untersuchungen von *Loewi* und *Häusler*[1]) über den Einfluß des Insulins auf die Permeabilität an Wahrscheinlichkeit. So scheinen uns die Ergebnisse unserer Versuche auf indirektem Wege eine Bestätigung der *Loewi*schen Anschauung über die Wirkungsweise des Insulins zu geben. Es erscheint uns nicht ausgeschlossen, daß die Erscheinungen der Insulinvergiftung mit durch diese Permeabilitätsänderungen bedingt sind. Daß möglicherweise auch die im Blute kreisende organisch gebundene Phosphorsäure durch Insulin insofern beeinflußt wird, daß ihre Abspaltung in der Niere gehemmt wird, darauf deutet das Ergebnis der Harnuntersuchung in dem einen Nüchternversuch hin. Wir haben bei der Besprechung der vermehrten Phosphorsäureausscheidung des Diabetikers nach Glucosezufuhr darauf hingewiesen, daß man sich vorstellen könnte, daß beim Diabetiker die Phosphorylierung in einer abwegigen Weise vor sich geht, so daß gebildete Komplexe in der Niere aufgespalten werden. Im Sinne dieser Auffassung liegt es, wenn wir umgekehrt dem Insulin die Wirkung zuschreiben, nicht nur die Phosphory-

[1]) Pflügers Archiv **210**, S. 238 bis 279, 1925,

lierung und damit die Assimilation in die Wege zu leiten, sondern auch zu resistenten, der Abspaltung widerstehenden Komplexen zu führen.

Zusammenfassung.

1. Beim nüchternen Normalen zeigt Insulin, trotz deutlicher Beeinflussung der Blutzuckerkurve, keinen wesentlichen Einfluß auf die Kurve der anorganischen Phosphorsäure.

2. Vorangehende Insulininjektion ändert den Typus der Kurve der alimentären Hyperglykämie nicht wesentlich. Die Kurve des anorganischen Phosphors zeigt von der nach Glucosezufuhr allein beobachteten mehrfache Abweichungen. Die Kurve für den gesamtsäurelöslichen Phosphor verläuft als Gerade.

Nephelometrische Untersuchungen über fermentative Eiweißspaltung.

VI. Mitteilung:

Zur Kinetik der tryptischen Spaltung.

Von

H. Kleinmann.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin, Charité.)

(Eingegangen am 27. Juli 1926.)

Mit 13 Abbildungen im Text.

Im Verfolg der Untersuchungen über die tryptische Spaltung mit Hilfe der nephelometrischen Methode wurde die Kinetik des fermentativen Vorganges einer Prüfung unterzogen. Die Möglichkeit in hochverdünnten Lösungen und daher mit sehr niedrigen Fermentkonzentrationen, ferner in großen Versuchsreihen zu arbeiten, führte zu Ergebnissen, die zu weiteren Versuchen anregen. Eine wesentliche Klärung des Problems ist erst von Untersuchungen mit gereinigten, von Beimengungen möglichst befreiten Fermentpräparaten zu erwarten. Zunächst wurden aber absichtlich nur filtrierte wässerige Auszüge von Pankreatin Rhenania verwendet, um Unterlagen zu verschaffen zur Feststellung, welche Eigenschaften dem Ferment an sich und welche der Anwesenheit von Begleitstoffen zuzuschreiben sind.

Geprüft wurde der Einfluß der Spaltungszeit, der Spaltprodukte, der Substrat- und Fermentkonzentration und der Temperatur auf den Verlauf der Zeitumsatzkurve. Bezüglich der Methode sei auf die Darstellung der vorherigen Mitteilung hingewiesen.

I. Einfluß der Spaltungszeit.

Wurde die Spaltung (bei p_H etwa 8) 120 bis 150 Minuten beobachtet, wobei die Fermentkonzentration so gewählt wurde, daß in 120 Minuten 60 bis 70 Proz. des Substrats gespalten wurde, so erhielt man — in Übereinstimmung mit den bereits in der Literatur vorhandenen An-

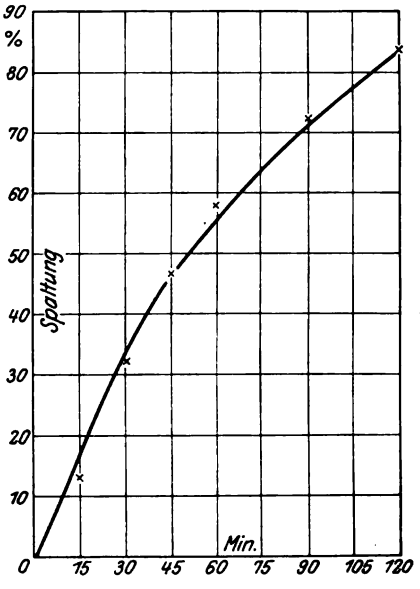


Abb. 1.

gaben[1]) — Kurven, die sich im Verlauf der Spaltung mehr oder weniger abflachten. Diese Kurven gehorchten zuweilen befriedigend der Formel einer monomolekularen Reaktion (vgl. Versuch 1, Abb. 1), meist konnte jedoch der Verlauf weder nach der mono- noch nach der bi- oder $1\frac{1}{2}$fach molekularen Reaktion dargestellt werden.

Naheliegend war es, die Abflachung der Kurven auf eine Schädigung des Trypsins zurückzuführen, da wir wissen, daß das Trypsin in wässeriger Lösung bei 37° bereits nach einem Stehen von 20 Minuten deutlich geschädigt wird. Da aber möglicherweise das Ferment in Gegenwart des Substrats geschützt wird, wurden Versuche zur Prüfung dieser Frage so angesetzt, daß gleichzeitig und unter den gleichen Bedingungen,

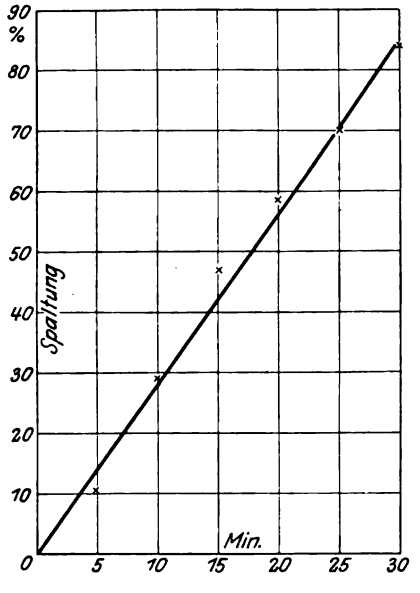


Abb. 2a (Versuch 4a).

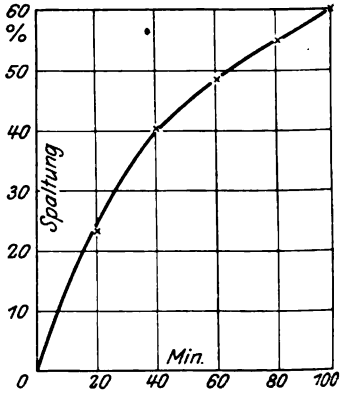


Abb. 2b (Versuch 4b).

[1]) Vgl. vor allem *R. Willstätter* und *H. Persiel*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **142**. 245 (252), 1924.

mit den gleichen Lösungen von Ferment und Substrat die Spaltungen während 30 und während 120 Minuten bis zu demselben Endumsatz

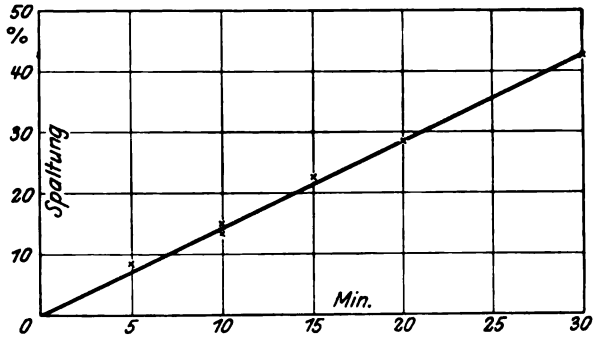


Abb. 3a (Versuch 5a).

verfolgt wurden. Die Versuche 4 und 5 (Abb. 2 und 3) zeigen, daß die 30-Minutenversuche geradlinig, die 120-Minutenversuche stark gekrümmt verlaufen. Besonders ausgeprägt ist die Verflachung bei noch längerer Versuchsdauer (175 Minuten) im Versuch 5. Aus den Versuchen 6 und 7 (Abb. 4) (hier Abnahme alle 4 Minuten) ist weiterhin ersichtlich, daß der Spaltungsverlauf während einer kürzeren Spaltungszeit (30 Minuten) und einem Umsatz bis zu etwa 50 Proz. geradlinig ist.

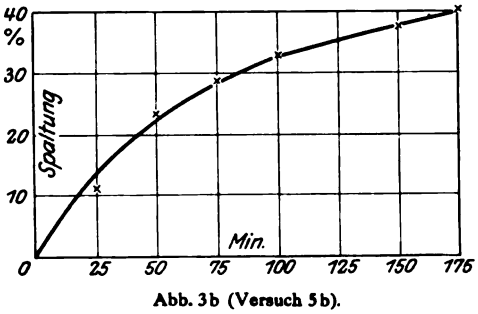


Abb. 3b (Versuch 5b).

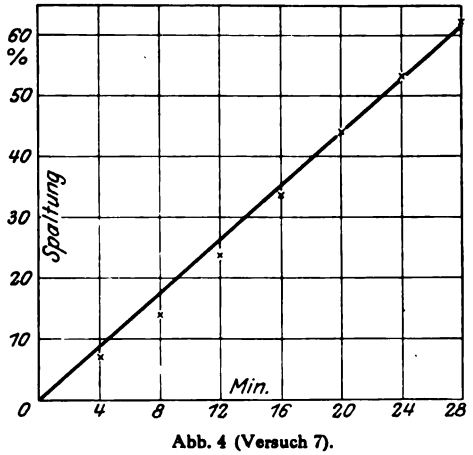


Abb. 4 (Versuch 7).

Aus diesen Versuchen muß der Schluß gezogen werden, daß das Trypsin während zweistündiger Spaltung eine Schädigung erfährt und infolgedessen der Umsatz abnimmt. Diese Schädigung kann durch Anstellung kurzdauernder Versuche vermieden werden. Alle folgenden Spaltungsversuche werden daher nur auf 30 Minuten ausgedehnt.

Bevor der Spaltungsverlauf unter der Einwirkung bestimmter Faktoren untersucht wurde, mußte festgestellt werden, ob verschiedene Puffersysteme von gleichem p_H unter sonst gleichen Bedingungen die Spaltung verschieden beeinflussen oder nicht. Wie aus Versuch 8 (Abb. 5) der mit Phosphat- und mit Glykokollpuffer von gleichem p_H angesetzt ist, ersichtlich, ist der Verlauf beider Parallelversuche gleich; eine spezifische Wirkung der Phosphationen oder des Glykokolls wurde nicht

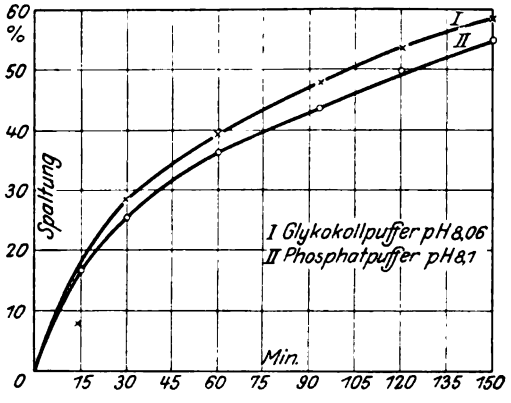


Abb. 5 (Versuch 8).

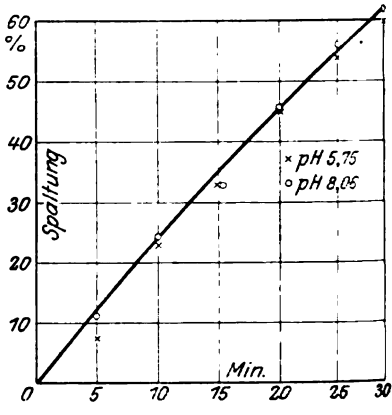


Abb. 6 (Versuch 9 bis 12).

beobachtet. Der Vergleich von Versuchen, die je nach dem erforderlichen p_H mit dem einen oder mit dem anderen p_H angestellt waren, war demnach möglich.

Um den Einfluß der H-Ionenkonzentration auf den Kurvenverlauf festzustellen, wurden Spaltungen bei variiertem p_H zwischen 5,75 und 9,42 vorgenommen, wobei die Fermentkonzentrationen so gewählt wurden, daß in allen Versuchen in gleichen Zeiten möglichst gleiche Umsätze erzielt wurden.

Die Versuche zeigen, daß die Änderung der H-Ionenkonzentration innerhalb der untersuchten Grenzen die Form der Zeitumsatzkurve nicht beeinflußt: Die Kurven verlaufen bei einer Spaltung von 30 Minuten bis zu einem Umsatz von etwa 50 Proz. geradlinig, um dann allmählich abzuflachen. (Versuch 9 bis 12, Abb. 6.)

II. Variation der Ferment- und der Substratkonzentration.

Bei allen weiteren Versuchen konnte die oben erwähnte Beobachtung bestätigt werden, daß bei Spaltungszeiten von 30 Minuten und Umsätzen bis zu 50 Proz. der Kurvenverlauf geradlinig ist. In manchen Fällen ist der geradlinige Verlauf auch noch bei höheren Umsätzen festzustellen, in anderen beginnt die Abflachung der Kurve

schon früher; in der großen Mehrzahl aller Versuche zeigt die Spaltung jedoch den erwähnten Verlauf. Wird die Spaltungsgeschwindigkeit vergrößert, was durch Erhöhung der Fermentkonzentration wie auch durch Verringerung der Substratkonzentration erreicht werden kann, so krümmen sich die Kurven mehr oder weniger stark. Für diese Erscheinung gäbe es eine Anzahl Erklärungsmöglichkeiten, die in den folgenden Abschnitten geprüft werden. Hier sei zunächst der Verlauf der Spaltung untersucht 1. bei Variierung der Fermentkonzentration bei gleicher Substratkonzentration, 2. bei Variierung der Substratkonzentration bei gleicher Fermentkonzentration und 3. bei Variierung beider Faktoren.

1. Änderung der Fermentkonzentration.

In den vorliegenden Versuchen wurden die Fermentkonzentrationen im Verhältnis 1 : 2, 2 : 3 und 3 : 4 variiert. Die Versuche 13 bis 15 werden als Beispiele vieler derartiger Versuche gegeben. (Vgl. Abb. 7.)

Die Versuche zeigen auch bei stärkerer Spaltung geradlinigen Kurvenverlauf, der sich am Ende mitunter leicht abflacht. Vergleicht man das Verhältnis der Umsätze gleicher Spaltungszeiten oder das Verhältnis der Umsatzzeiten gleicher Umsätze, welche Betrachtungen das gleiche Ergebnis liefern, solange man den geradlinigen Anteil des Kurvenverlaufs betrachtet, so findet man, daß die Fermentmengen in recht guter Übereinstimmung sich umgekehrt wie die Spaltungszeiten verhalten bzw. direkt proportional den Umsätzen gleicher Zeiten. Im allgemeinen ist das Umsatzverhältnis etwas größer als dem Verhältnis der Fermentkonzentration entspricht, d. h. die stärkere Fermentlösung spaltet etwas stärker als es dem Proportionalitätsgesetz entspricht. Dieses Verhalten tritt besonders am Anfang der Kurven hervor. Im großen und ganzen ist aber die umgesetzte Eiweißmenge der angewandten Fermentkonzentration proportional: wenn die Fermentmenge F in einer bestimmten Zeit die Substratmenge S umsetzt, so setzt die Fermentmenge nF in derselben Zeit die Substratmenge nS um.

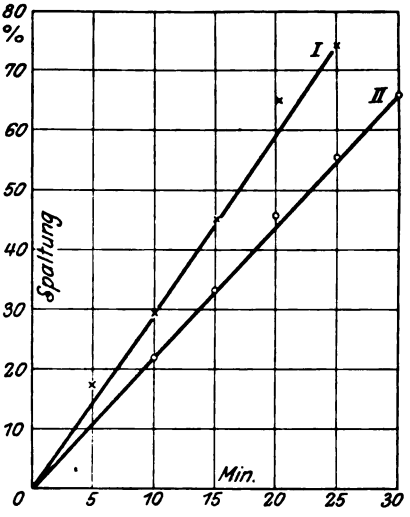


Abb. 7.

2. Änderung der Substratmengen.

Die Versuche wurden so angestellt, daß bei gleicher Fermentmenge verschiedene Volumina der Natriumcaseinatlösung der Spaltung unterworfen wurden. Die Differenz der Volumina wurde mit destilliertem Wasser ausgeglichen, wobei durch vorsichtigen Zusatz von NaOH in allen Versuchsreihen der gleiche p_H hergestellt wurde. (Vgl. Versuch 16, 17, 18; Abb. 8.)

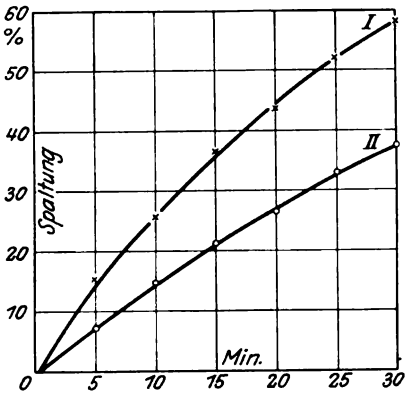


Abb. 8. (Vers. 17.)

Die Versuche bei Variation der Substratkonzentration im Verhältnis 1 : 2, 2 : 3 und 3 : 4 zeigen, daß die Substratkonzentrationen sich annähernd umgekehrt wie die Umsätze gleicher Zeiten verhalten. Doch zeigen die Kurven geringerer Substratkonzentration, also die schnelleren Spaltungen, eine stärkere Tendenz, sich abzuflachen als bei Vermehrung der Fermentkonzentration. Verläuft die Spaltung sehr langsam (Versuch 18), so bleiben die ersten Punkte stark unterhalb des Kurvenganges der geraden Linie zurück, während die späteren Abnahmen von 10 bis 15 Minuten an gut auf einer Geraden liegen. Dieses Verhalten spricht dafür, daß die Spaltung nicht unmittelbar beim Fermentzusatz, sondern erst nach einiger Zeit beginnt.

3. Änderung der Ferment- und der Substratmenge.

Die Versuche (vgl. Versuch 19 bis 23; Abb. 9 und 10) wurden so angestellt, daß gegen eine Vergleichsspaltung mit den Mengen F und S einmal eine Spaltung mit S und F und dann mit $^1/_2 F$ und $^1/_2 S$ angesetzt wurden. Waren diese Änderungen reziprok, wie sich dies aus den obigen Versuchen mit einiger Wahrscheinlichkeit ergibt,

so mußten sie zu den gleichen Kurven führen. Dies konnte in der Tat in einer Zahl der Fälle, wenn auch nicht immer beobachtet werden. Wir finden hier ein Verhalten, das für eine Reaktion nullter Ordnung charakteristisch ist. Es liegt nahe, für die „ideale" Zeit-Umsatzkurve die gerade Linie anzunehmen und ihre Abweichung als sekundär bedingt aufzufassen. Doch müssen diese Verhältnisse noch weiter verfolgt werden.

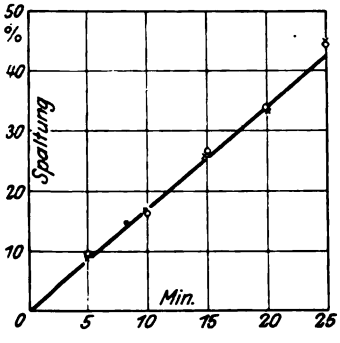


Abb. 9.
○ = Substrat 1, Ferment 1.
× = Substrat 1/2, Ferment 1/2.

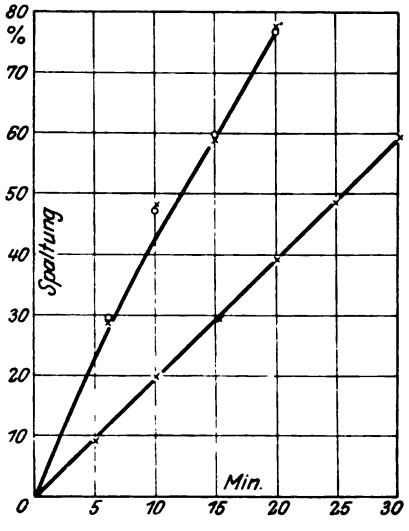


Abb. 10.
○ = Substrat 1, Ferment 1.
× = Substrat 1/2, Ferment 1/2.
Untere Linie: Substrat 1, Ferment 1/2.

III. Einfluß der Spaltprodukte auf die Spaltung.

Weiterhin wurde den Möglichkeiten nachgegangen, die einen Einfluß auf die Gestalt der Zeit-Umsatzkurve ausüben könnten. Zu diesem Zwecke wurden zunächst Spaltungsreihen angesetzt, bei denen von vornherein Spaltprodukte zugemischt waren und diese Systeme wurden gegen solche ohne Spaltprodukte verglichen.

Als Spaltprodukte wurden dieselben Caseinlösungen, die zur Untersuchung der tryptischen Spaltung verwendet wurden, so lange mit Trypsin gespalten, bis sie mit Chinidin keine Reaktion mehr zeigten, also im Sinne der Methode zu 100 Proz. aufgespalten waren. Diese Lösungen wurden zur Zerstörung des Trypsins aufgekocht. Außerdem wurden auch ungekochte Caseinlösungen, die zu 100 Proz. aufgespalten waren, zu neuen Spaltungen zugesetzt (vgl. weiter unten). Schließlich wurden auch Spaltprodukte, die durch vorsichtige Säurehydrolyse aus der gleichen Natriumcaseinatlösung, die wir zur Spaltung benutzten, hergestellt waren, zu den Versuchen zugesetzt. Die Säurespaltprodukte wurden natürlich neutralisiert, hierbei — wie überhaupt bei allen folgenden Versuchen — wurde sorgfältig darauf geachtet, daß der Ionengehalt der verglichenen Systeme stets der gleiche war.

Die Spaltprodukte wurden auf ihren Gehalt an Gesamt-N und Amino-N analysiert. Der Gesamt-N der Natriumcaseinatlösungen blieb natürlicherweise durch die tryptische Spaltung unverändert. Während aber die Natriumcaseinatlösungen keinen Amino-N-Gehalt zeigten, enthielten die zu 100 Proz. aufgespaltenen Lösungen (also die keine Chinidinreaktion mehr gaben) 25 Proz. Amino-N. Das gleiche Verhalten zeigte die durch Säure bis zum Verschwinden der Chinidinreaktion hydrolysierte Spaltproduktlösung. Auch sie zeigte einen Gehalt von 25 Proz. Amino-N. Die Bestimmung erfolgte nach der *van Slyke*schen Methode.

Da die Möglichkeit bestand, daß die Spaltprodukte in höherer Konzentration einen Einfluß auf die Trübung des Eiweißes mit Chinidin und hierdurch auf die nephelometrisch ermittelten Werte ausüben könnten, wurden Fermentversuche, denen Spaltproduktlösungen zugemischt waren, angestellt, die die eigentlichen Versuche nachahmten. Dabei wurde die Abnahme der Eiweißmenge nicht durch Fermentspaltung, wie bei den eigentlichen Versuchen, sondern durch Verdünnung bzw. Entnahme entsprechend kleinerer Volumina der Caseinlösung erzielt.

Versuch 23a zeigt die theoretischen und die gefundenen Werte, die im Fehlerbereich der Methode liegen. Er zeigt also, daß auch bei den Versuchen mit Spaltprodukten die Methode einwandfreie Werte gab.

a) Einfluß gekochter tryptischer Spaltprodukte.

Die Spaltprodukte wurden so hergestellt, daß eine Mischung, wie sie zur Untersuchung der Spaltungen benutzt wird, bis zum Verschwinden der Chinidintrübung aufgespalten wurde. Nur wurde die doppelte Menge Caseinlösung, d. h. 24 ccm bei 46 ccm Gesamtvolumen angewandt; es wurde auch eine stärkere Fermentlösung (1 : 500) zur Spaltung verwandt. Das System wurde genau so behandelt wie eine sonstige Fermentspaltung, d. h. es wurden angesetzt: 10 ccm Casein, Phosphatpuffer p_H 8,02, destilliertes Wasser zu 46 ccm. 10 ccm wurden entnommen und verworfen, 4 ccm Fermentlösung hinzugefügt. Spaltung 1 bis 2 Stunden bei 37° bis zum Verschwinden der Chinidinreaktion. Hierauf wurde die Lösung 5 Minuten gekocht und das weggekochte Wasser ersetzt. Von dieser Lösung wurden 15 ccm dem eigentlichen Spaltungsversuch zugesetzt. Diese Menge entsprach rund 60 Proz. der Spaltprodukte, die aus dem Casein der Spaltungsversuche überhaupt entstehen konnten. Die Spaltungen begannen also mit einem Spaltproduktgehalt von 60 Proz. Außerdem wurde eine Vergleichslösung hergestellt, die völlig analog der „Spaltproduktlösung" hergestellt wurde, nur enthielt sie kein Casein, sondern das gleiche Volumen einer sehr verdünnten NaOH-Lösung vom selben p_H wie die Caseinlösung. Ihre Herstellung war sonst hinsichtlich Puffer, Fermentzugabe, Kochen usw. ganz genau so wie die der „Spaltproduktlösung". Von dieser Vergleichslösung wurden nun ebenfalls 15 ccm derjenigen Spaltung zugefügt, gegen die die Spaltung, die von vornherein 60 Proz. Spaltprodukte enthielt, verglichen wurde. Die Lösungen unterschieden sich also allein in ihrem Gehalt an Spaltprodukten, von denen bei Beginn der Spaltung der Gehalt der einen 60 Proz., der anderen aber 0 war. Es erwies sich als vorteilhaft, die Spaltprodukte nur mit n/30 Puffer anzusetzen und den Untersuchungslösungen nur so viel Puffermenge zuzusetzen, daß ihr Gehalt m/15 Puffer nicht überschritt.

Versuche mit 60 Proz. Spaltprodukten im Vergleich mit Spaltungen ohne von vornherein zugesetzte Spaltprodukte (Abb. 11) zeigten gar keine bzw. (Abb. 12) eine äußerst geringe, innerhalb der Methodenfehler liegende Verzögerung. Diese Versuche wurden oft mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

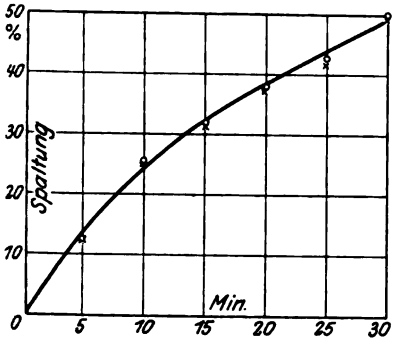


Abb. 11.
× = ohne Spaltprodukte.
○ = mit Spaltprodukte.

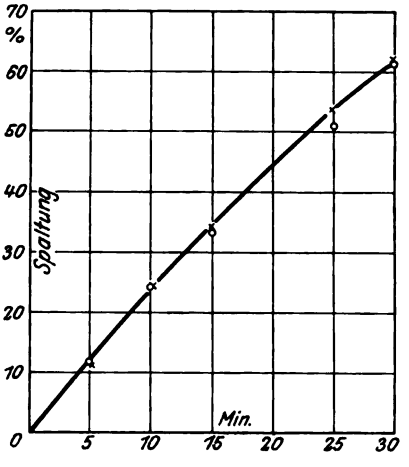


Abb. 12.
× = ohne Spaltprodukte.
○ = mit Spaltprodukte.

b) Einfluß ungekochter tryptischer Spaltprodukte.

Um den etwaigen Einfluß des Kochens auszuschalten, wurden Spaltprodukte wie oben hergestellt; nur wurde das in ihnen noch vorhandene Ferment nicht zerstört, sondern das noch wirksame Ferment zur Spaltung der Versuche, denen das Spaltprodukt zugemischt wurde, mit verwandt und seine Wirksamkeit durch eine passende Menge frischen Ferments nur ergänzt.

Das Vergleichssystem wurde genau so hergestellt, wie oben geschildert, d. h. es wurde eine Lösung von derselben Zusammensetzung wie die Spaltproduktlösung, aber ohne Spaltprodukte bereitet. Schematisch sieht die Versuchsanordnung folgendermaßen aus:

I	II
Spaltproduktlösung	Vergleichsspaltproduktlösung
Caseinlösung, Puffer, Wasser, Fermentlösung	Puffer, Wasser, Fermentlösung
Ia	IIa
Versuchssystem	Vergleichsversuchslösung
Casein, Puffer, Wasser, Ferment + (15 ccm) Lösung I	Casein, Puffer, Wasser, Ferment + (15 ccm) Lösung II

Die zu vergleichenden Systeme unterscheiden sich nur darin, daß I 60 Proz. Spaltprodukte enthält und II nicht.

Die Versuche 26 und 27 zeigen, daß die tryptischen Spaltprodukte keinen Einfluß auf die Spaltung ausüben.

c) Einwirkung von Säurespaltprodukten.

Zur Herstellung von Säurespaltprodukten wurden 250 ccm der Original-Natriumcaseinlösung mit 30 ccm n HCl versetzt und auf dem Wasserbad wieder auf 250 ccm eingeengt. Die Lösung wurde am Rückflußkühler einige Tage gekocht, wobei sie sich allmählich bräunlich färbte. Hin und wieder wurden Proben von 1 bis 2 ccm entnommen und mit Chinidin geprüft. Die entnommenen Mengen wurden durch Zusatz einer gleichkonzentrierten Salzsäure wieder ersetzt. Die Lösung wurde so lange gekocht, bis sie keine Chinidinreaktion mehr zeigte. Sodann wurden 30 ccm n NaOH hinzugegeben und das Volumen wieder auf 250 ccm gebracht. Auf diese Weise war aus einer Caseinlösung eine 100 Proz. Spaltprodukte enthaltende Säurespaltproduktlösung hergestellt. Als Vergleichsspaltproduktlösung dienten 250 ccm NaOH vom gleichen p_H wie die Caseinlösung + 30 ccm n HCl + 30 ccm n NaOH. Die Lösung wurde ebenfalls auf 250 ccm eingeengt. Von der ersten Lösung wurden 7,2 ccm = etwa 60 Proz. Spaltprodukte den Versuchen zugesetzt. Dem Vergleich wurden 7,2 ccm der Vergleichsspaltproduktlösung hinzugefügt.

Wie Versuch 28 zeigt, üben auch die Säurespaltprodukte in der vorliegenden Versuchsanordnung, ebenso wie das tryptische Spaltprodukt keinerlei Einfluß auf die tryptische Spaltung.

Diese Ergebnisse stehen anscheinend in Widerspruch mit den Angaben von *Northrop* über den hemmenden Einfluß der Spaltprodukte auf die tryptische Spaltung, Angaben, die wir bei Wiederholung der Versuchsanordnung von *Northrop* bestätigen konnten. Man muß aber bedenken, daß *Northrop* den Fortschritt der fermentativen Spaltung durch die Zunahme der Leitfähigkeit, die durch die Vermehrung der Spaltprodukte bedingt ist, nachwies, während bei uns das Verschwinden des hochkolloidalen ursprünglichen Eiweißkörpers bestimmt wird. Es spricht vieles dafür, daß die beiden Methoden verschiedene „Gebiete" der fermentativen Spaltung erfassen, die verschieden von den Spaltprodukten beeinflußt werden. Es ist auch zu beachten, daß diejenige Fraktion des Verdauungsgemischs, die den „Hemmungskörper" von *Northrop* darstellt, nicht identisch mit unseren „Spaltprodukten" ist.

IV. Einfluß der Temperatur auf die Gestalt der Zeit-Umsatzkurve.

Es wurde weiterhin versucht, die Spaltungsgeschwindigkeit zu ändern, ohne die Ferment-Substratkonzentration zu verschieben. Hierzu wurden Spaltungen bei gleichem Ferment- und Substratgehalt, aber bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt, um verschiedene Geschwindigkeiten des Spaltungsvorgangs zu erzielen.

Die Versuche 32 und 33 (Vgl. Abb. 13) zeigen, daß für den Kurvenverlauf gleich ist, ob die Erhöhung der Geschwindigkeit durch Variation des Ferments bzw. des Substrats oder durch Variation der Temperatur erreicht wird. Stets sind die Kurven, die eine höhere Anfangsgeschwindigkeit haben, stärker gekrümmt, während die Kurven mit geringer Anfangsgeschwindigkeit geradlinig verlaufen.

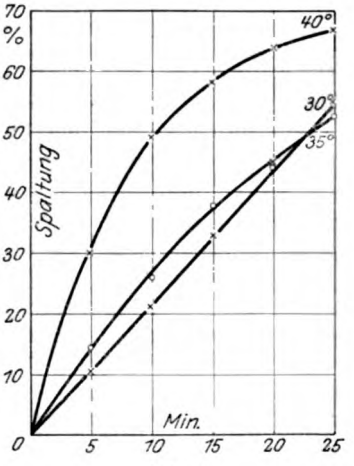


Abb. 13.

Aus dem Vorherigen ist ersichtlich, daß die Spaltungskurven im Zeitraum von 30 Minuten nur dann geradlinig sind, wenn die Spaltung in dieser Zeit etwa bis 50 Proz. geht. Verläuft die Spaltung schneller, so werden die Kurven gekrümmter. Soweit es sich bis jetzt übersehen läßt, beruht diese Änderung der Kurvenform bei Änderung der Anfangsgeschwindigkeit nicht auf einer Änderung des Bindungsverhältnisses Ferment—Substrat, wenn die Geschwindigkeit durch Variation der Ferment- oder Substratkonzentration geändert wird. Auch die Acidität des Milieus, wie auch die Spaltprodukte können nach den vorliegenden Untersuchungen für die Verzögerung des Spaltungsvorgangs nicht verantwortlich gemacht werden. Weitere Untersuchungen an gereinigten Fermenten werden wohl eine Aufklärung des Wesens der funktionellen Beziehung zwischen Anfangsgeschwindigkeit und Kurvenkrümmung bringen.

Auszug aus den Protokollen.

Versuch 1. Verlauf der Caseinspaltung bei 120 Minuten Spaltungszeit. Es wurden gleichzeitig vier Parallelversuche angestellt. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer, destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 7000, p_H 7,8.

Minuten:	15	30	45	60	90	120
Spaltung, Proz.	13,4	32,4	47,9	57,04	72,2	84,4

t	$a-x$	$\frac{1}{t}\log\frac{a}{a-x} = k \cdot 10^3$
15	86	5,395
30	67	6,014
45	53	5,947
60	43	5,942
90	28	5,973
120	16	6,613

Versuch 2. Verlauf der Caseinspaltung bei 120 Minuten Spaltungszeit. Es wurden gleichzeitig vier Parallelversuche angesetzt. Zusammensetzung wie oben, p_H 7,8.

Minuten:	15	30	45	60	90	120	150
Spaltung, Proz.	23,9	36,3	50,1	62,8	71,3	77,1	80,0

Versuch 3. Verlauf der Caseinspaltung bei 60 Minuten Spaltungszeit. Fermentkonzentration in I und II wie 1 : 2. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 12 ccm Phosphatpuffer, destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung in I 1 : 4000, in II 1 : 2000, p_H in I 8,2, in II 8,18.

Minuten:	15		30		35		45		60	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung, Proz.	25,4	45,1	33,3	70,0	51,1	87,2	66,7	—	81,9	—

Versuch 4. Verlauf der Spaltung bei 30 Minuten (I) und bei 120 Minuten (II) Spaltungszeit. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (p_H 8,04), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung (in I 1 : 3000, in II 1 : 9000).

	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Minuten:	5	20	10	40	15	60	20	80	25	100
Spaltung, Proz.	10,6	23,4	29,8	40,4	47,2	48,1	58,6	55,4	70,8	60,6

Versuch 5. Verlauf der Spaltung bei 30 Minuten (I) und bei 175 Minuten (II) Spaltungszeit. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung in I 1 : 3000, in II 1 : 8000, p_H in I 8,03, in II 8,01.

	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Minuten:	5	25	10	50	20	100	30	150	—	175
Spaltung, Proz.	8,8	11,1	13,1	22,5	28,3	32,6	42,6	37,1	—	40,2

Versuch 6. Verlauf der Spaltung bei 30 Minuten Spaltungszeit. Es wurden vier Parallelversuche angesetzt. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (p_H 8,09, $^1/_{15}$ m), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000.

Minuten:	5	10	15	20	25	30
Spaltung, Proz.	4,3	15,9	34,0	42,6	48,7	59,5

Versuch 7. Verlauf der Spaltung bei 30 Minuten Spaltungszeit. Es wurden drei Parallelversuche angesetzt. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (p_H 8,09, $^1/_{15}$ m), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Ferment 1 : 3000.

Minuten:	4	8	12	16	20	24	28
Spaltung, Proz.	5,7	13,4	24,3	34,0	44,4	53,2	62,6

Versuch 8. Tryptische Caseinspaltung in Gegenwart von Glykokollpuffer (I) und von Phosphatpuffer (II). Zusammensetzung: I 12 ccm Caseinlösung, 12 ccm Glykokollpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,06), destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Fermentlösung 1:6500. II 12 ccm Caseinlösung, 12 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,1), 4 ccm Fermentlösung 1 : 6500. In I p_H 8,06, in II 8,04.

Minuten:	15		30		60		90		120		150	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	6,9	16,6	28,1	25,9	39,35	36,3	47,5	43,3	53,1	50,0	58,0	55,0

Versuch 9. Tryptische Caseinspaltung bei einem p_H 5,75 (I) und p_H 8,6 (II). Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 5,78 in I, 8,07 in II), destilliertes Wasser zu 46 ccm. 4 ccm Fermentlösung 1 : 2400 in I, 1 : 3200 in II. (Vorlagepuffer für I p_H 8,06, für II 7,78.)

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	7,1	10,6	23,9	24,6	32,7	33,3	45,1	45,9	55,8	56,2	60,3	59,8

Versuch 10. Tryptische Caseinspaltung bei einem p_H 6,95 (I) und p_H 7,62 (II). Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 6,96 in I, 7,78 in II), 4 ccm Fermentlösung 1 : 2500 in I, 1 : 3000 in II. (Vorlagepuffer für I p_H 7,78, für II 7,78.)

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	10,4	8,3	22,7	21,0	36,5	35,4	54,1	53,1	70,3	64,3	77,5	78,3

Versuch 11. Tryptische Caseinspaltung bei einem p_H 8,96 (II) und einem p_H 8,03 (I). Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,03 in I, und p_H 8,98), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000 (in I), 1 : 2500 (in II). (Vorlagepuffer für I p_H 7,78, für II 7,75.)

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	13,8	13,8	27,4	25,2	37,3	33,3	47,3	45,9	54,6	61,2	57,2	58,4

Versuch 12. Tryptische Caseinspaltung bei einem p_H 8,02 (I) und p_H 9,42 (II). Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,02 in I und p_H 9,42 in II), destilliertes Wasser zu 46 ccm. Fermentlösung 1 : 3000 (I) und 1 : 2400 (II). (Vorlagepuffer für I p_H 7,78, für II p_H 6,79.)

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	13,6	12,2	28,8	27,3	45,0	43,3	56,3	55,3	69,1	69,1	77,3	75,3

Versuch 13. Caseinspaltung bei verschieden Fermentmengen (Verhältnis 1 : 2) bei gleichem p_H. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung. 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,02), destilliretes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 1000 (I) und 1 : 2000 (II).

Minuten:	5		10		15		20		25	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung, Proz.	33,3	17,3	62,5	36,3	79,4	—	88,1	62,3	—	72,3

Versuch 14. Caseinspaltung bei verschiedenen Fermentmengen (Verhältnis 2 : 3) bei gleichem p_H. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,02), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 1000 (I), 1 : 1500 (II).

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	10,0	6,4	25,8	15,9	36,1	20,4	51,9	29,1	63,6	38,1	77,0	47,7

Versuch 15. Caseinspaltung bei verschiedenen Fermentmengen (Verhältnis 4 : 3) bei gleichem p_H. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,0), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 1000 (I), 1 : 1333 (II).

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	17,1	—	30,5	22,7	45,2	33,3	64,7	46,2	74,4	54,8	—	65,6

Versuch 16. Caseinspaltung bei gleichen Ferment- und variierten Substratmengen (Verhältnis 1 : 2), bei gleichem p_H. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung (in I), 6 ccm Caseinlösung (in II), 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,0), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000.

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	5,2	18,2	12,3	28,6	19,1	37,3	24,3	46,2	—	53,1	35,8	62,6

Versuch 17. Caseinspaltung bei gleichen Ferment- und variierten Substratmengen (Verhältnis 2 : 3), bei gleichem p_H. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung (in I), 18 ccm Caseinlösung (in II), 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,02), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000.

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	16,0	7,1	25,8	15,0	36,0	21,3	43,3	26,5	52,8	33,3	58,0	—

Versuch 18. Caseinspaltung bei gleichen Ferment- und variierten Substratmengen (Verhältnis 3 : 4), bei gleichem p_H. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung (in I), 16 ccm Caseinlösung (in II), 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,02), 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000.

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	14,9	3,8	24,2	9,9	35,8	21,2	47,6	33,1	56,3	42,7	65,8	51,2

Versuch 19. Caseinspaltung bei gleichsinniger Variation der Ferment- und Substratmenge. Zusammensetzung: in I 12 ccm Caseinlösung, 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000, in II 6 ccm Caseinlösung, 4 ccm Fermentlösung 1 : 6000; je 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,02), destilliertes Wasser zu 46 ccm.

Minuten:	5		10		15		20		25	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung, Proz.	21,9	22,0	23,9	23,9	26,7	26,7	33,3	33,8	45,4	45,8

Versuch 20. Caseinspaltung bei gleichsinniger Variation der Ferment- und Substratmenge. Zusammensetzung: I 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000, p_H 8,02. II 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 1500, p_H 8,02. III 6 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000, p_H 8,02.

Minuten:	5			10			15		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Spaltung, Proz.	13,1	25,4	25,8	20,5	39,4	39,8	32,7	62,5	62,9

Minuten:	20			25			30		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Spaltung, Proz.	44,2	71,9	71,5	49,1	85,5	83,7	60,9	—	—

Versuch 21. Caseinspaltung bei gleichsinniger Variation der Ferment- und Substratmenge. Zusammensetzung: I 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Ferment 1 : 3500. II 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Ferment 1 : 1750. III 6 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Ferment 1 : 3500.

Minuten:	5			10			15		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Spaltung, Proz.	7,2	16,9	18,4	18,2	33,3	35,9	31,4	50,0	50,0

Minuten:	20			25		
	I	II	III	I	II	III
Spaltung, Proz.	43,4	65,4	69,5	49,8	76,9	80,4

Versuch 23. Caseinspaltung bei gleichsinniger Variation der Ferment- und der Substratmenge. Zusammensetzung: I 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Ferment 1 : 3000. II 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Ferment 1 : 1500. III 6 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Ferment 1 : 3000.

Minuten:	5			10			15		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Spaltung, Proz.	9,1	29,7	30,5	20,1	48,1	47,4	29,7	59,2	59,5

Minuten:	20			25			30		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Spaltung, Proz.	39,2	78,7	78,5	48,2	—	—	59,4	—	—

Versuch 23a. Einfluß der Spaltprodukte bei der nephelometrischen Ablesung. I Verdünnung der Caseinlösung mit destilliertem Wasser. II Verdünnung mit Säurespaltprodukten. III Verdünnung mit fermentativen Spaltprodukten.

I		II		III	
Theoretischer Wert Proz.	Gefundener Wert Proz.	Theoretischer Wert Proz.	Gefundener Wert Proz.	Theoretischer Wert Proz.	Gefundener Wert Proz.
20	20,0	20	19,8	20	19,8
40	41,3	40	41,1	40	42,5
60	58,5	60	62,2	60	63,4

Versuch 24. Einfluß der Spaltprodukte auf die tryptische Caseinspaltung. Spaltprodukte: 48 ccm Caseinlösung, 30 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 7,94), destilliertes Wasser zu 92 ccm, davon 72 ccm mit 8 ccm Fermentlösung 1 : 150 versetzt, bei 40° im Wasserbad bis zur Eiweißfreiheit aufgespalten, dann 10 Minuten gekocht. Vergleichslösung: 48 ccm destilliertes Wasser + 30 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, mit NaOH auf p_H 7,94 gebracht), auf 92 ccm aufgefüllt, bei 40° 8 ccm Fermentlösung (1 : 150) hinzugefügt, 10 Minuten gekocht. Stammlösung: 72 ccm Caseinlösung, 90 ccm Phosphatpuffer (wie oben), destilliertes Wasser zu 186 ccm.

Zusammensetzung: I 31 ccm Stammlösung, 15 ccm Spaltprodukte, 4 ccm Fermentlösung (1 : 2900), r_H 7,98. II 31 ccm Stammlösung, 15 ccm Spaltprodukte, 4 ccm Fermentlösung (1 : 2900), r_H 7,98.

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	13,5	13,5	25,0	25,3	31,7	31,5	37,5	37,3	41,2	42,6	49,1	49,3

Versuch 25. Einfluß der Spaltprodukte auf die tryptische Caseinspaltung. Spaltprodukte: 48 ccm Caseinlösung (p_H 10,35), 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 7,94), destilliertes Wasser zu 92 ccm. Sonst wie im Ver-

such 24 behandelt. Vergleichssalzlösung: 48 ccm destilliertes Wasser (mit NaOH auf p_H 10,69 gebracht), 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 7,94), destilliertes Wasser zu 92 ccm. Sonst wie im Versuch 24. Stammlösung: 72 ccm Caseinlösung, 90 ccm ($^1/_{15}$ m) Phosphatpuffer (p_H 8,04), destilliertes Wasser zu 186 ccm.

Zusammensetzung: I 31 ccm Stammlösung, 15 ccm Spaltprodukte, 4 ccm Fermentlösung 1 : 3100, p_H 7,98. II 31 ccm Stammlösung, 15 ccm Vergleichssalzlösung, 4 ccm Fermentlösung 1 : 3100, p_H 8,01.

Minuten:	5		10		15		20		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . Proz.	24,5	27,2	33,8	37,2	44,1	46,8	50,3	52,9	55,2	59,3	63,8	65,8

Versuch 26. Einfluß der Spaltprodukte (ungekocht). I 24 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{30}$ m), p_H 8,0, destilliertes Wasser zu 46 ccm (10 ccm verworfen) + 4 ccm Fermentlösung 1 : 500. II 24 ccm destilliertes Wasser, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{30}$ m), p_H 8,0, destilliertes Wasser zu 46 ccm (10 ccm verworfen) + 4 ccm Fermentlösung 1 : 500. Ia 12 ccm Caseinlösung + 15 ccm Lösung I, 15 ccm Puffer ($^1/_{15}$ m), destilliertes Wasser zu 46 ccm + 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000. IIa 12 ccm Caseinlösung + 15 ccm Lösung II, 15 ccm Puffer ($^1/_{15}$ m), destilliertes Wasser zu 46 ccm + 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000. Ia p_H 8,0, IIa 7,99.

Minuten:	10		15		20		25	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung . . Proz.	11,2	11,5	24,6	23,6	32,7	32,2	44,0	44,4

Versuch 27. Einfluß der Spaltprodukte (ungekocht). Anordnung wie im Versuch 26. I p_H 8,1, II p_H 8,09.

Minuten:	5		10		15		20		25	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung, Proz.	9,9	11,5	23,1	25,1	33,2	33,3	40,5	42,3	47,5	48,0

Versuch 28. Einfluß der Säurespaltprodukte auf die tryptische Caseinspaltung. I 12 ccm Caseinlösung, 7,2 ccm Säurespaltprodukte, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,02), destilliertes Wasser zu 46 ccm. II 12 ccm Caseinlösung, 7,2 ccm Salzgemisch[1]), 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,02), destilliertes Wasser zu 46 ccm. Zu I und II je 4 ccm Fermentlösung 1 : 3000.

Minuten:	5		10		15		25		30	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Spaltung, Proz.	11,1	11,1	24,8	24,5	34,1	33,7	53,7	51,0	61,5	61,5

[1]) Das Salzgemisch enthält dieselbe Menge Cl- und Na-Ionen wie Lösung I.

Versuch 32. Tryptische Caseinspaltung bei verschiedenen Temperaturen. Zusammensetzung: 12 ccm Caseinlösung, 15 ccm Phosphatpuffer ($^1/_{15}$ m, p_H 8,02), destilliertes Wasser zu 46 ccm, 4 ccm Fermentlösung 1 : 2500. III bei 25°, II bei 35°, I bei 40°.

Minuten:	5			10			15			25			30		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Spalt., Proz.	18,1	9,9	6,1	32,0	22,7	13,0	51,6	35,7	27,2	66,7	56,5	48,8	68,9	—	—

Versuch 33. Tryptische Caseinspaltung bei verschiedenen Temperaturen. Zusammensetzung wie in Versuch 32. I bei 30°, II bei 35°, III bei 40°.

Minuten:	5			10			15			20			25		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Spalt., Proz.	10,8	14,5	30,8	21,0	25,8	50,0	33,2	37,8	57,6	45,0	44,4	64,5	55,0	54,2	66,8

Zur nephelometrischen Methodik der Trypsinbestimmung.

Von

P. Rona und **H. Kleinmann.**

Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 27. Juli 1926.)

In dieser Zeitschr. **169**, 4/6, 320 ist von uns eine Methode der Messung tryptischer Vorgänge beschrieben worden, die auf der Trübung von Natriumcaseinatlösungen mittels 5 ccm heiß gesättigtem Chinidin. hydrochlor.-Lösung und nephelometrischer Trübungsmessung beruht.

Die als Reagens benutzte Lösung von Chinidin. hydrochlor. wurde so bereitet, daß in einem, in einem siedenden Wasserbad stehenden Kolben Chinidin. hydrochlor. bis zur Sättigung gelöst wurde und die Lösung mindestens 24 Stunden lang auskristallisieren gelassen wurde. Die klare, grün gefärbte Lösung wurde abfiltriert und diente als Reagens. Der Kristallbrei wurde wieder mit H_2O versetzt und erneut zu einer heiß gesättigten Lösung verarbeitet, usf.

Es zeigte sich nun bei längerem Arbeiten, daß bei ständiger Benutzung der immer wieder in der Kälte auskristallisierenden Chinidinkristalle die Trübungskraft des Reagens abnimmt. Auch zeigte sich, daß verschiedene Proben Chinidin. hydrochlor. bei völlig gleicher Bereitung gesättigte Lösungen ergaben, die verschiedene Trübungskraft besitzen. Zusammen mit der Trübungskraft geht auch das proportionale Verhalten von Trübung und Konzentration verloren. Ein Neutralisieren der schwach alkalischen Chinidinlösung führte sie mitunter auf ihr normales Verhalten zurück, nützte aber nicht immer. Dagegen wird die oft stark grüne Färbung der Lösungen, die stört, beim Neutralisieren gelblicher und sehr viel heller. Bei Anwendung von 7,5 ccm der verschiedenen Chinidinlösungen unter den vorliegenden Bedingungen glichen sich aber die Unterschiede stets aus, und stets war gute Proportionalität bis 75 bis 80 Proz. Spaltung zwischen Trübung und Konzentration vorhanden.

Es hat also den Anschein, als ob beim Lösen des Chinidin. hydrochlor. mitunter eine Substanz entsteht (Base?), die oberflächenaktiv die

Trübungen beeinflußt oder auf die Löslichkeitsverhältnisse des Chinidins wirkt.

Daher wurde die gegebene Methode so verändert, daß die heiß gesättigten Chinidinlösungen mit einigen Tropfen verdünnter HCl schwach lackmussauer gemacht werden. Die Lösung muß dann mindestens 24 Stunden auskristallisieren.

Es werden von ihr dann nicht mehr 5 ccm unter den gegebenen, in der Methode genau beschriebenen Bedingungen, sondern 7,5 ccm als Reagens verwandt.

Das Gesamtvolumen der zu messenden Lösungen beträgt dann nicht mehr 20, sondern 22,5 ccm, auf die dann mit H_2O aufgefüllt werden muß.

Haben wir nach dieser Vorschrift gearbeitet, so erhielten wir immer zuverlässige Werte.

Untersuchungen über Photoaktivität.

Von

Norbert Henning und **Werner Schaefer.**

(Aus der Infektionsabteilung des städtischen Rudolf-Virchow-Krankenhauses, Berlin.)

(Eingegangen am 29. Juli 1926.)

Mit 15 Abbildungen im Text.

Den Ausgangspunkt vorliegender Untersuchungen bildete die Feststellung *Takahashis* (1), daß ein von ihm hergestelltes Vitamin-A-Präparat, „Biosterin", im Dunkeln in die Nähe einer photographischen Platte gebracht, diese so „belichtet", daß sich an der betreffenden Stelle nach Entwicklung eine Schwärzung ergibt. Die Reaktion wurde verstärkt, wenn das Präparat vorher mit ultraviolettem Licht bestrahlt war. *Hamano* (2) konnte die Zahl der „photoaktiven" Substanzen beträchtlich erweitern (Cholesterin, Lebertran, Butter, Olivenöl usw.). Dieses Phänomen war um so erstaunlicher, als eben *Hess* (3), *Hess* und *Weinstock* (4), *György* (5), *Parsons* (6) u. a. über die Heilung bzw. Verhütung der menschlichen und experimentellen Rachitis mit bestrahltem Lebertran, pflanzlichen Ölen, Milchpulver usw. berichtet hatten. *Takahashi* und *Hamano* nahmen auf Grund ihrer Versuche einen Parallelismus zwischen Vitaminreichtum und Photoaktivität an. Nach Abschluß unserer Untersuchungen wurden uns die Arbeiten von *Vollmer* (7), *Haxthausen* (8) und *Beck* (9) bekannt.

Methodik.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden in gewöhnlichen Blockschälchen, die bis zu 1 mm vom Rande gefüllt waren, bestrahlt. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfquarzlampe (*Bachs* künstliche Höhensonne). Dauer der Bestrahlung eine halbe Stunde bei einem durchschnittlichen Abstand von 20 cm. Nach der Bestrahlung wurden die Schälchen in der Dunkelkammer in lichtsichere Holzkästen gebracht und dort mit photographischen Platten (Agfa Extrarapid) bedeckt. Die Schichtseite der Platte war der bestrahlten Masse zugekehrt. Expositionszeit 24 Stunden, danach Entwicklung und Fixierung in der üblichen Weise.

Befunde.

Unser Bestreben ging ursprünglich dahin, mit der Methode *Takahashi-Hamanos* zu neuen Erkenntnissen über den biologischen Mechanismus der Ultravioletttstrahlenwirkung zu gelangen. Wir nahmen an, daß das in den Hautkapillaren strömende Blut bei Bestrahlungen des lebenden Organismus mit Quarzlicht einen Teil der wirksamen Strahlenenergie aufnimmt, eine Vermutung, die *v. Schubert* (10) jüngst mit einer anderen Versuchsanordnung experimentell erhärtet hat. Unsere ersten Versuche erstreckten sich auf Bestrahlung von Blut in vitro.

Es wurden untersucht gewaschene rote Blutkörperchen, Citratplasma und Serum vom Menschen. Die Erythrocyten wurden eine Stunde bei 20 cm Abstand unter der Höhensonne bestrahlt und in der oben beschriebenen Weise mit der photographischen Platte exponiert. Nach Entwicklung der Platte (24stündige Expositionszeit) zeigte sich an der Einwirkungsstelle eine geringe fleckige Schwärzung. Diesen Befund konnten wir jedoch in zwei weiteren Versuchen nicht wieder erzielen. Unbestrahlte Erythrocyten wie unbestrahltes und bestrahltes Plasma und Serum zeigten ebenfalls keinen Belichtungseffekt. *Vollmer* fand bestrahltes Serum schwach photoaktiv.

Die Bestrahlung des Blutes in vivo wurde an weißen Mäusen ausgeführt. Vier Tiere wurden nach Enthaarung des Rückens in 25 cm Abstand eine halbe Stunde bestrahlt. Mit dem nach der Bestrahlung durch Dekapitation gewonnenen Blute ließ sich auch bei zweimaliger Wiederholung des Versuchs eine deutliche Wirkung auf die lichtempfindliche Platte nicht nachweisen. Ebenso verlief das Exponieren des Blutes von Normaltieren ohne positives Ergebnis.

An dieser Stelle möchten wir auf einen Befund aufmerksam machen, der auch von anderer Seite beobachtet wurde. Nach Entwicklung von Platten, die mit Blut, Serum oder Citratplasma angesetzt waren, sah man in der Wirkungszone nicht eine Schwärzung, sondern eine Aufhellung gegen die übrige Schichtfläche. *Wermel* (11) erklärt diese Erscheinung als eine Gerbwirkung des Serums. Wir sahen sie indes auch bei destilliertem Wasser und bei in Wasser gelösten photoinaktiven Substanzen auftreten. Weiterhin geprüft auf ihre Photoaktivität wurden verschiedene Organe nach Zerreibung im Mörser. Das Ergebnis — es wurden gewählt Hirn, Lunge, Herz, Leber, Milz und Nieren der weißen Maus — war gleichfalls ein negatives.

Nachdem unsere Untersuchungen im Tierversuch negativ verlaufen waren, wandten wir uns dem Studium des von *Takahashi* und *Hamano* beschriebenen Phänomens zu. In einem Vorversuch konnten wir ihre Angaben, daß unbestrahlter Lebertran wenig photoaktiv ist, bestrahlter stärker, bestätigen. Da sich bei den Bestrahlungen unter der Quarzlampe in den gewählten geringen Entfernungen nach kurzer Zeit stets eine beträchtliche Erwärmung des Untersuchungsobjektes einstellte, ein Übelstand, den wir mit unseren Mitteln nicht beseitigen konnten, so untersuchten wir einige nicht bestrahlte Substanzen nach Erwärmung auf verschiedene Temperaturen hinsichtlich ihrer Photoaktivität, um eine mögliche Fehlerquelle auszuschließen.

Das Ergebnis eines solchen Versuchs zeigen die Abb. 1 bis 5.

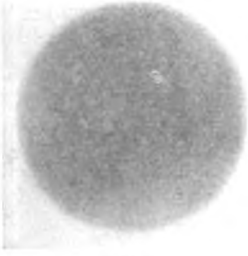


Abb. 1.

Abb. 2.

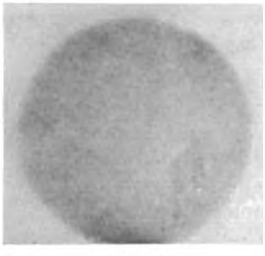


Abb. 3.

Abb. 4.

Abb. 5.

Erhitzt man Lebertran im Wasserbad eine halbe Stunde auf 100° (Abb. 2), so zeigt er sich stärker photoaktiv als der unbehandelte Lebertran (Abb. 1). Ein kurzes Aufkochen des Tranes schwächt seine normale „Belichtungsfähigkeit" etwas ab (Abb. 3). Eine stärkere Abschwächung erfolgte nach 10 Minuten langem Sieden (Abb. 4). Dehnt man das Sieden auf 20 Minuten aus, so wird der Lebertran inaktiv (Abb. 5). Es zeigte sich also, daß eine halbstündige Erwärmung auf 100° den Lebertran ähnlich beeinflußte wie die Ultraviolettbestrahlung. Vereinigte man nun beides, Bestrahlung und nachfolgende Erwärmung, so war zu erwarten, daß eine

Summierung beider Wirkungen eintreten würde. Ein Versuch bestätigte die Annahme. Lebertran wurde eine halbe Stunde bei 20 cm Abstand unter der Höhensonne bestrahlt. Ein Teil der bestrahlten Substanz wurde anschließend eine halbe Stunde im Wasserbad auf 100° erhitzt und nach Abkühlung exponiert. Zur Kontrolle wurde bestrahlter, nicht erhitzter und unbehandelter Lebertran mitangesetzt (Abb. 6 bis 8).

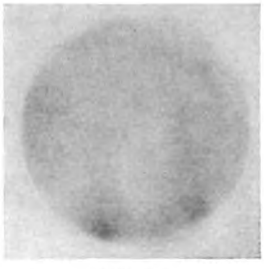


Abb. 6.
Lebertran, nicht behandelt.

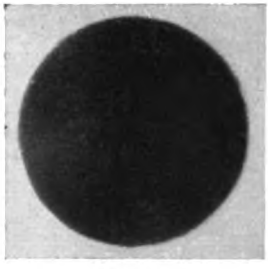


Abb. 7.
Lebertran 30 Min. bei 20 cm Abstand bestrahlt.

Abb. 8.
Lebertran nach Bestrahlung 30 Min. bei 100°.

Abb. 8 zeigt deutlich, daß die Höhensonnenbestrahlung und nachfolgende Erwärmung sich in ihren Wirkungen addieren.

Noch einwandfreier ließ sich der Nachweis einer Photoaktivierung durch Wärme am Ricinusöl erbringen.

Ricinusöl ist spontan, d. h. unbestrahlt nach unseren Untersuchungen photochemisch inaktiv (Abb. 9), während es nach Quarzlampenbestrahlung auf der Bromsilberplatte eine starke Schwärzung hervorruft. 30 Minuten bei 60° im Wasserbad gehaltenes Ricinusöl erhält bereits eine leichte Photoaktivität (Abb. 10). Stärker wird die Aktivierung nach einem halbstündigen Verweilen im Wasserbad bei 100° (Abb. 11). Eine Höhensonnenbestrahlung von 30 Minuten bei einem Abstand von 20 cm löst eine noch stärkere Wirkung aus (Abb. 12). Es war für die Wärmeaktivierung des Ricinusöls gleichgültig, ob die Erhitzung auf 100° bei diffusem Zimmerlicht oder im Dunkeln erfolgte.

Angesichts dieser Ergebnisse erhob sich die Frage: Sind Ultraviolettlicht- und Wärmewirkung in Hinsicht auf ihre Photoaktivierungs-

Abb. 9.

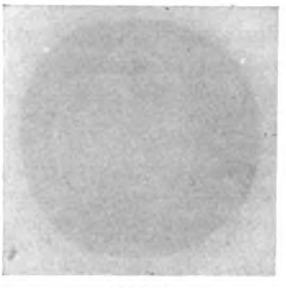


Abb. 10.

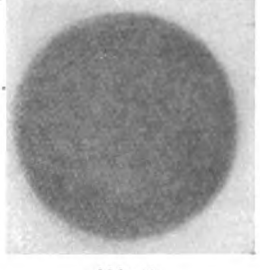


Abb. 11.

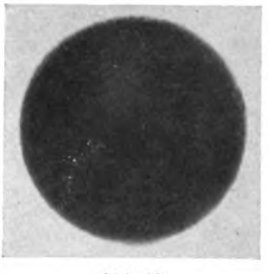


Abb. 12.

fähigkeit identisch? Besteht ein Unterschied nur quantitativ zugunsten der Strahlen? Beide Faktoren wurden verglichen an inaktiviertem Material. Lebertran wurde durch 20 Minuten langes Sieden seiner aktiven Fähigkeiten beraubt und nach Abkühlung eine halbe Stunde im Wasserbade auf 100° erhitzt. Die mit ihm exponierte Platte bot keine Schwärzung, während die Ultraviolettbestrahlung in der oben angegebenen Intensität dem Lebertran seine frühere Eigenschaft zurückgab[1]) (Abb. 13). In analoger Weise ließ sich eine Aktivierung und Inaktivierung durch verschiedene Temperaturen und eine Reaktivierung durch Höhensonnenbehandlung durchführen am Leinöl, einem spontan photochemisch wirksamen Körper.

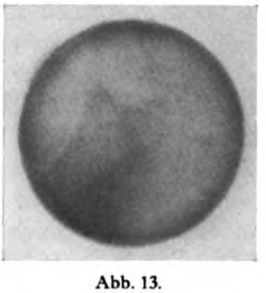


Abb. 13.

[1]) Auch *Vollmer* fand, daß die Photoaktivität des Lebertrans nach einem halbstündigen Sieden verloren geht und nach Bestrahlung wieder auftritt.

Wir hatten bisher mit Materialien gearbeitet, die, weil tierischer bzw. pflanzlicher Herkunft, nicht chemisch reinen Körpern entsprachen. So enthalten z. B. die pflanzlichen Öle außer den Glycerinestern der Palmitin- bzw. Oleinsäuren noch viele andere, zum Teil ungesättigte Fettsäureglyceride. Es wäre also möglich, daß das „leuchtende" Prinzip einer chemisch nicht bekannten Beimengung anhafte. Wir wandten uns also zu synthetisch hergestellten Substanzen verwandter Natur. Als solche wurde das Tributyrin gewählt.

Bei der Prüfung auf spontane Photoaktivität erwies es sich als sehr schwach wirksam (Abb. 14). Durch Quarzlampenbestrahlung wurde die Einwirkung auf die photographische Platte enorm gesteigert (Abb. 15). Dagegen ließ sich eine Aktivierung durch Wärme nicht nachweisen.

Abb. 14.

Abb. 15.

Da die Öle bzw. Fette Glycerinester der Fettsäuren sind, prüften wir Glycerin und einige Fettsäuren auf ihre photoaktiven Eigenschaften. Glycerin, Stearinsäure und Palmitinsäure waren bestrahlt und unbestrahlt ohne Photoeffekt. Propionsäure mußten wir ausscheiden, da sie trotz eines zwischen Platte und Säure geschalteten Celluloidfilters (0,1 cm Dicke), das bei anderen aktiven Substanzen die Strahlen passieren ließ, die Gelatineschicht der Platte auflöste. Als spontan schon stark wirksam fanden wir die ungesättigte Oleinsäure, ein Befund, auf den auch *Hamano* hinweist. Die stark ätzende Buttersäure wurde im Expositionskasten ebenso behandelt wie die Propionsäure. Wir legten ein 0,2 cm dickes Celluloidfilter zwischen Plattenschichtseite und Säure. Es ließ sich nach 24stündiger Exponierung bei der bestrahlten Buttersäure ein deutlicher Lichteffekt auf der Platte entwickeln. Die unbestrahlte Buttersäure war bei dieser Versuchsanordnung nicht wirksam. Dagegen blieb das Natriumsalz der Buttersäure auch nach Bestrahlung inaktiv.

In den Vitamin C enthaltenden Fruchtsäften (Citronensaft, Apfelsinensaft, Tomatensaft) konnten wir auch nach Bestrahlung photoaktive Substanzen nicht nachweisen (*Vollmer*).

Zur Aufklärung des Wesens der Photoaktivierung im Zusammenhang mit dem Vitaminproblem glaubten wir in Befunden von *Webster* und *Baudisch* (12) einen gewissen Wegweiser zu haben. Diese Forscher hatten gefunden, daß Ferrocyankalium nach Belichtung die Fähigkeit gewinnt, bei Zusatz zu Nährböden Bakterien, wie Pneumokokken und Influenzabazillen, zu einem guten Wachstum zu bringen, während diese sonst nur auf bluthaltigen Nährböden gedeihen. Ferner hatten sie gefunden, daß alle aktiven Eisensalze die Benzidinreaktion geben, indem sie dabei ebenfalls die Funktion des Blutes als sauerstoffübertragenden Ferments übernehmen. Uns schien es denkbar, daß vielleicht ebenfalls bei der Bestrahlung photoaktiver Vitaminträger ein Stoff entstände, der die Fähigkeit besitzt, als Sauerstoffüberträger zu wirken und dementsprechend bei der Benzidinreaktion die Stelle des Blutes zu ersetzen.

Bei der Prüfung unserer photoaktiven und photoinaktiven Substanzen stellte sich nun folgendes heraus: Im Gegensatz zu unseren Voraussetzungen trat nirgends ohne Blutzusatz die Benzidinreaktion ein. Dagegen trat bei den spontan photoaktiven Substanzen Terpentinöl, Lebertran und Leinöl nach Zusatz von Benzidin und Eisessig eine kräftige Gelb- bis Braunfärbung auf, während das photoinaktive Ricinusöl, Paraffin und Tributyrin fast unverändert blieben. Wurden nun die Lösungen mit wässeriger Blutlösung unterschichtet, so entstand in der Grenzschicht eine Blaugrünfärbung, also Benzidinreaktion, die in kurzem wieder verschwand. Bei dem am stärksten photoaktiven Terpentinöl hielt sie etwa eine halbe Minute lang an, während sie beim Lebertran und Leinöl schon nach einigen Sekunden verschwand.

Es zeigte sich also, daß das Wasserstoffsuperoxyd, das bei der Benzidinreaktion gewöhnlich gebraucht wird, durch die photoaktiven Substanzen ersetzt wurde, d. h. die photoaktiven Stoffe wirkten als Sauerstoffspender. Dabei sei darauf hingewiesen, daß man mit Wasserstoffsuperoxyd auch auf der Platte einen sehr starken Belichtungseffekt erzielt.

Über ähnliche Beobachtungen hat *Vollmer* berichtet. Er fand, daß bestrahlte Substanzen aus Jodkalium Jod in Freiheit setzen, und daß hierbei ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Photoaktivität und der Jodausscheidung besteht, die er an der Blaufärbung einer Stärkelösung maß. Wir konnten bei unseren Versuchen seine Befunde bestätigen. Spontan nicht photoaktive Substanzen, die erst nach Bestrahlung aktiv werden, wie Tributyrin und Ricinusöl, wurden nach der Bestrahlung auch der Jodreaktion gegenüber positiv, während

die Benzidinreaktion, die dafür offenbar erheblich unempfindlicher ist, negativ blieb.

Es entstehen also bei der Bestrahlung sauerstoffhaltige Verbindungen, die ihren Sauerstoff an leicht oxydable Stoffe von selbst, oder an schwerer oxydable mit Hilfe eines sauerstoffübertragenden Ferments abgeben.

Daß derartige Oxydationen unter Photoaktivitätserscheinungen einhergehen können, ist von *Radsiscewsky* (13) an einer Reihe organischer Körper, darunter Terpenen und Lecithin, beschrieben worden, die bei langsamer Oxydation in alkalischer Lösung selbstleuchtend werden. Ferner hat *Hamano* festgestellt, daß der Photoeffekt bei Sauerstoffabschluß viel schwächer ist.

Ob nun die nach Bestrahlung beobachtete Vitaminanreicherung auf dieser Oxydationswirkung beruht oder ob sie mit ganz andersartigen, unter Ultraviolettbestrahlung vor sich gehenden, vielleicht strukturchemischen Umlagerungen zusammenhängt, ist noch ungeklärt. Von der Zimtsäure, die spontan inaktiv, nach Bestrahlung photoaktiv wurde (siehe auch *Hamano*), z. B. ist bekannt, daß sie sich unter dem Einfluß ultravioletten Lichtes von der gewöhnlichen Trans-Form in die Cis-Form umlagert. Jedoch zeigt sich auch hier Ausscheidung von Jod aus Jodkaliumlösung nach Bestrahlung, also gleichzeitig eine Oxydationswirkung.

Vor allem aber ist es noch fraglich, ob die Erscheinung der Photoaktivität überhaupt immer mit antirachitischer Wirkung verbunden ist. Fütterungsversuche mit chemisch so einfach organisierten Verbindungen wie Tributyrin könnten hier vielleicht Aufklärung bringen. Chemisch tritt der Photoaktivierungseffekt offenbar an dem Fettsäureanteil des Fettes auf, da bestrahltes Glycerin photoinaktiv bleibt und auch keine Jodausscheidung gibt, während Buttersäure nach Bestrahlung photoaktiv wird und auch, genau wie Tributyrin, Jodausscheidung herbeiführt. Das Natriumsalz der Buttersäure blieb nach Bestrahlung in Substanz und in wässeriger Lösung photoinaktiv und bewirkte auch keine Jodausscheidung.

Änderungen im Verhalten von Doppelbindungen haben wir bei unseren Substanzen mit der Entfärbung von Bromwasser und der Braunfärbung einer verdünnten Lösung von Kaliumpermagnanat und Natriumcarbonat geprüft und keine Neuentstehung nach Bestrahlung beobachtet. Leinöl und Zimtsäure behielten vor und nach Bestrahlung ihre Doppelbindungen.

Literatur.

1) *Takahashi*, Journ. Chem. Soc. Japan **44**, 59; Journ. of the Inst. of Phys. and Chem. Research **3**, Nr. 6; zitiert nach *Hamano*. — 2) *Hamano*,

diese Zeitschr. **168**, 1926. — 3) *Hess*, Amer. Journ. of dis. of childr. **28**, 517. — 4) *Hess* und *Weinstock*, Journ. of biol. Chem. **62**, 1924. — 5) *György*, Klin. Wochenschr. 1926, Nr. 17; Jahrb. f. Kinderheilk. **61**, H. 3/4. — 6) *Parsons*, Brit. med. Journ. 1926, Nr. 3403. — 7) *Vollmer*, diese Zeitschr. **172**, 467. — 8) *Haxthausen*, Hospitalstidend. **68**, 585, 1925. — 9) *Beck*, Tag. d. südwestdeutschen u. niederrh.-westf. Kinderärzte. Wiesbaden, 11. April 1926; referiert Deutsch. med. Wochenschr. 1926, S. 1110. — 10) *v. Schubert*, Deutsch. med. Wochenschr. 1926, S. 903. — 11) *Wermel*, Münch. med. Wochenschr. 1914, S. 299. — 12) *Webster* und *Baudisch*, Naturwissenschaften 1925. — 13) *Radsiscewski*, Liebigs Ann. **208**.

Über die Wasserstoffionenkonzentration und das Säurebindungsvermögen der Muttermilch bei Säuglingskakke.

Von

Buichiro Matsumoto.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen Universität zu Kanazawa-Kanazawa-Ikwa-Daigaku.)

(Eingegangen am 30. Juli 1926.)

Einleitung.

Im Jahre 1921 haben *S. Shizume* und *B. Shirai* (1) über die Wasserstoffionenkonzentration — [H·] — und das Säurebindungsvermögen der gesunden Frauenmilch und der Milch von Kakkekranken veröffentlicht, daß, obgleich die [H·] bei den letzteren nicht oder nur unbedeutend vermehrt, das Säurebindungsvermögen deutlich vermindert erscheine. Später führte *S. Ohi* (2) dieselben Versuche bei der normalen Frauenmilch, dem Colostrum und der Milch von Säuglingskakke aus, und er kam zu dem Schluß, daß zwischen der normalen Frauenmilch und Kakkemilch in bezug auf die [H·] und das Säurebindungsvermögen kein Unterschied zu finden sei. Seit dem Jahre 1923 habe ich mich auch auf Anregung und unter Leitung von Prof. *K. Suto* mit derselben Frage beschäftigt, um die genannten Verhältnisse nachzuprüfen. Das Untersuchungsmaterial erhielt ich hauptsächlich aus der Kinderklinik von Prof. *K. Ohta*, Vorstand der Abteilung des Krankenhauses „Senkyo-Byoin" in Tokio, dem ich an dieser Stelle für seine Freundlichkeit meinen herzlichen Dank ausspreche.

Methodisches.

Zur Messung der [H·] habe ich die von *L. Michaelis* (3) modifizierte *Nernst*sche Gaskettenmethode benutzt. Die dazu benutzte Einrichtung wurde jedoch in unserem Laboratorium von *K. Suto* weiter verbessert. Die zu prüfende Milch wurde sofort in das *Michaelis*sche V-Rohr gegossen, und wie üblich gereinigtes Wasserstoffgas eingeführt und beides gut durchgemischt. Nach etwa ½ Stunde, d. h. nachdem die Milch mit dem Wasserstoffgas gesättigt war, fing ich an zu messen; die Ablesung war meistens nach etwa 30 bis 45 Minuten beendet.

I. Vorversuche.

Bevor ich zu den eigentlichen Versuchen überging, untersuchte ich zuerst die [H˙], das Säurebindungsvermögen sowie die von Verdünnung und Temperatur usw. herrührenden Änderungen der [H˙] und des Säurebindungsvermögens der im Handel vorkommenden Kuhmilch. Dadurch konnte ich die Fehlerquellen klarstellen und den eigentlichen Versuch unter möglichst günstigen Bedingungen ausführen.

1. Die [H˙] der Kuhmilch.

Im Jahre 1913 hat *H. Davidsohn* (4) über die [H˙] der Kuhmilch berichtet, daß das p_H derselben im Mittel 6,57 ist. Ich habe auch das p_H der im Handel vorkommenden gekochten Kuhmilch untersucht. Die Resultate sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Die [H˙] (p_H) der Kuhmilch.

Nr.	Zeit nach dem Ansetzen der Milch in die V.-Rohre					p_H im Mittel	Temperatur der Milch
	10–15′	30–40′	1h	1,5h	2h		
1a	6,56	—	6,58	6,58	—	6,58	16,5—17°
1b	6,59	—	6,58	6,59	—		
2a	6,57	—	6,57	6,57	—	6,58	22°
2b	6,59	—	6,59	6,59	—		
3a	—	—	6,62	6,62	6,62	6,61	18°
3b	—	—	6,59	6,59	6,62		
4a	6,59	6,59	6,57	6,57	6,57	6,55	16,5°
4b	6,43	6,43	6,50	6,57	6,57		
5a	6,56	6,56	—	6,56	6,58	6,58	17°
5b	6,59	6,59	—	6,59	6,58		
6a	6,63	6,63	—	6,66	6,65	6,64	17°
6b	6,63	6,66	—	6,66	6,65		
7a	6,59	6,61	6,62	6,61	6,61	6,60	16,5—17°
7b	6,59	6,59	6,59	6,59	6,61		
8a	—	—	6,52	6,52	—	6,52	17°
8b	—	—	6,52	6,52	—		
9a	—	—	6,63	6,60	—	6,63	18°
9b	—	—	6,63	6,60	—		
10a	—	—	6,56	6,57	—	6,57	18°
10b	—	—	6,57	6,57	—		
11a	—	6,57	6,57	—	—	6,58	
11b	—	6,59	6,59	—	—		
12	—	6,61	6,61	—	—	6,61	

Wert von p_H { Maximum . . . 6,64 / Minimum . . . 6,52 / Mittel 6,59

Wie die Tabelle I zeigt, ist die Schwankung der [H˙] relativ gering, d. h. der Wert der Wasserstoffzahl der gekochten Kuhmilch ist fast konstant. Die [H˙] der gekochten Milch bleibt bei Zimmertemperatur (18 bis 20° C) wenigstens 2 Stunden lang fast konstant, genauer gesagt, sie vermindert sich ein wenig — wahrscheinlich durch Abgabe

von CO_2 —, vermehrt sich aber niemals, d. h. es findet dabei keine bemerkbare Bildung von Milchsäure statt.

2. Das Säurebindungsvermögen der Kuhmilch.

H. Aron (5) hat das Säurebindungsvermögen der Frauen- und der Kuhmilch-p_H ermittelt, indem er einmal bei der Milch allein, ein anderes Mal mit einer bestimmten Menge n/10 oder n HCl versetzte und mit destilliertem Wasser auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt hat. Die Versuche ergaben, daß das Säurebindungsvermögen der Kuhmilch wesentlich größer ist als das der Frauenmilch. Um die Acidität der beiden Milcharten gleichzumachen, muß man eine drei- bis vierfache Menge HCl zu der Kuhmilch hinzusetzen. *Aron* bediente sich aber so konzentrierter HCl-Lösungen, und in so großer Menge, daß es unmöglich war, genauere Beziehungen in dem Säurebindungsvermögen festzustellen. Ich habe daher unter Anwendung sehr verdünnter HCl, nämlich n/1000, n/500, n/300 und n/250, untersucht. Die Resultate sind in den Tabellen II, III, IV und V verzeichnet.

Tabelle II.

Versuch über das Säurebindungsvermögen der Kuhmilch mit n/1000 HCl.

Nr.		Mischungsverhältnis von n/1000 HCl und Milch							Zimmertemperatur
		1:0	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	
1	p_H . . .	6,67	6,75	6,81	6,80	6,78	6,67	—	18,2°
2	„ . . .	6,54	6,68	6,69	6,71	6,68	6,66	6,66	18,4°
	Mittelwert	6,60	6,71	6,75	6,75	6,73	6,67	6,66	

Aus Tabelle II erhellt:

1. Wenn man die zu prüfende Kuhmilch mit n/1000 HCl auf das dreifache Volumen verdünnt, so vermindert sich die Wasserstoffionenkonzentration der Milch (Paradoxe Erscheinung, s. unten).

2. Versetzt man weiter mit n/1000 HCl, dann steigt die $[H^+]$ der Milch allmählich.

Aus diesem Versuch habe ich ersehen, daß es unzweckmäßig ist, mit so stark verdünnter HCl-Lösung das Säurebindungsvermögen der Kuhmilch zu ermitteln. Danach habe ich n/500 HCl benutzt.

Tabelle III.

Derselbe Versuch mit n/500 HCl.

	Mischungsverhältnis von n/500 HCl und Milch						Zimmertemperatur
	1:0	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	
p_H .	6,56	6,61	6,61	6,57	6,58	6,50	19°

Die Konzentration der Salzsäure reicht noch nicht aus, um das Bild des Bindungsvermögens anschaulich zu machen. Deshalb stellte ich weitere Versuche mit n/250 HCl-Lösung an.

Tabelle IV.

Derselbe Versuch mit n/250 HCl.

	Mischungsverhältnis von n/250 HCl und Milch						Zimmer-temperatur
	1:0	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	
p_H .	6,65	6,61	6,50	6,36	6,27	6,22	

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß in diesem Falle durch Zusatz des gleichen Volumens HCl-Lösung der Anstieg der [H·] der Milch bemerkbar ist und mit der Menge der Säure allmählich ansteigt. Man kann also sagen, daß die zweckmäßigste Konzentration der Salzsäure für die Ermittlung des Bindungsvermögens, wenigstens in diesem Falle, etwa n/250 ist. Erinnert man sich an das Verhältnis des Eiweiß- und Salzgehalts der Frauen- zur Kuhmilch, so läßt sich das stärkere Säurebindungsvermögen der Kuhmilch im Vergleich zu dem der Frauenmilch leicht verstehen. Zur Bestimmung des Säurebindungsvermögens der Frauenmilch habe ich daher n/1000 HCl-Lösung benutzt (s. unten).

Dann wiederholte ich denselben Versuch (Tabelle V) mit n/300 HCl-Lösung.

Tabelle V.

Nr.	Mischungsverhältnis von n/300 HCl und Milch							Zimmer-temperatur	Zeit nach dem Ansetzen
	1:0	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6		
1a	6,48	6,46	6,34	6,26	6,19	6,11	5,99	24°	15′
1b	6,48	6,45	6,34	6,29	6,21	6,12	5,99	24	1h
1c	6,48	6,45	6,38	6,33	6,24	6,16	6,02	24	1,5h
2a	6,50	6,46	6,38	6,26	6,17	6,11	5,99	24,1°	15′
2b	6,50	6,46	6,40	6,28	6,19	6,12	5,99	24,1	30
3a	6,52	6,49	6,39	6,28	6,22	6,12	6,02	26°	15
3b	6,55	6,49	6,42	6,30	6,22	6,10	6,05	26	30
4a	6,48	6,45	6,35	6,24	6,17	6,04	5,98	28,2°	15
4b	6,48	6,45	6,37	6,24	6,18	6,05	5,98	28,2	30
4c	6,50	6,45	6,37	6,26	6,18	6,06	5,98	28,2	45
Mittel (p_H):	6,50	6,46	6,38	6,27	6,20	6,11	6,00		

Die Resultate bei diesem Versuch sind vollkommen analog mit denen des vorigen, Tabelle IV. Man kann also mit Recht sagen, daß für die Untersuchung des Säurebindungsvermögens der Frauenmilch n/1000 HCl, der Kuhmilch n/250 bzw. n/300 HCl am zweckmäßigsten ist.

3. Der Einfluß der Verdünnung auf die [H·] der Kuhmilch. (Paradoxe Erscheinung und Pufferwirkung der Kuhmilch.)

Daß beim Zusatz von sehr verdünnter Säure zu der Milch die Reaktion derselben nach der alkalischen Seite verschoben wird, ist eine nicht nur bei Kuhmilch, sondern auch bei Frauenmilch vorkommende, sonderbare

Erscheinung. *G. Kato* hat auch bei Reiskleienextrakt ähnliche Beobachtungen gemacht und sie auf die wasserstoffionenvernichtende Wirkung des Kleienextrakts zurückgeführt, ohne irgend eine eingehende Erklärung des Mechanismus zu geben. Da der genannte Mechanismus wahrscheinlich recht kompliziert ist, habe ich auch darauf verzichtet, eine Erklärung desselben zu geben. Ich glaube aber, daß die einfache Verdünnung dabei wohl eine wichtige Rolle spielt. Wenn ein Volumenteil Milch mit demselben Volumen sehr verdünnter HCl-Lösung versetzt wird und alle Säure gänzlich von den Milchbestandteilen gebunden würde, so hätte die Milch ihre ursprüngliche Wasserstoffionenzahl im zweifachen Volumen, und demzufolge müßte die Reaktion trotz des Säurezusatzes nach der alkalischen Seite verschoben werden.

Auf Grund dieser Annahme habe ich den Einfluß der einfachen Verdünnung mit destilliertem Wasser auf die [H·] der Milch untersucht. Das hierbei benutzte sorgfältig destillierte Wasser war selbstverständlich im Kolben aus hartem Glas gut gekocht.

Tabelle VI.

Verdünnung und p_H der Kuhmilch.

	Mischungsverhältnis von Milch und H_2O							Zimmertemperatur
	1:0	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	
p_H . .	6,51	6,65	6,72	6,79	6,82	6,85	6,87	25°

Aus dieser Tabelle ersieht man, daß durch Verdünnung mit Wasser die Acidität der Milch stufenweise abnimmt und sich nach und nach dem Neutralpunkt im wahren Sinne nähert; d. h. daß die Pufferwirkung der Milch nicht so groß ist wie die von Blut und Harn. Es ist schon bekannt, daß die [H·] des Blutes durch Verdünnung mit der fünffachen Menge 0,854proz. Kochsalzlösung sich nicht verändert, und daß die des Harns ebenfalls durch Verdünnung mit der zwei- bis dreifachen Menge destillierten Wassers oder 2proz. Kochsalzlösung keine Veränderung aufweist. Zum Vergleich führe ich hier die Pufferwirkung des Standardacetatgemisches an, die dem Praktikum der medizinischen Chemie von *K. Suto* — japanisch — entnommen ist.

Tabelle VII.

	Mischungsverhältnis von Standardacetatgemisch und H_2O			
	1:0	1:1	1:3	1:7
p_H . . .	4,55	4,61	4,63	4,65

Aus diesem Versuch dürfte man wohl begreifen, daß bei der Untersuchung des Säurebindungsvermögens der Milch nicht nur die zugesetzten, der Säure entsprechenden Wasserstoffionen von den Milchbestandteilen gebunden werden, sondern auch durch einfache Verdünnung die [H·] der Milch sich vermindern kann. Dadurch wird wenigstens ein Teil der paradoxen Erscheinung verständlich.

4. Der Einfluß der Verdünnung auf das Säurebindungsvermögen der Kuhmilch.

Wie schon erwähnt, steht das Säurebindungsvermögen der Milch in innigem Zusammenhang mit dem Gehalt an Eiweiß und Salz. Vergleicht man daher das Säurebindungsvermögen der zwei- oder dreifach verdünnten Milch mit dem der unverdünnten, so geht daraus hervor, daß das Säurebindungsvermögen der ersteren deutlich kleiner ist als das der letzteren.

*Tabelle VII*a.

Das Säurebindungsvermögen der unverdünnten Milch.

	Unverdünnte Milch : n/333 HCl						Zeit nach dem Ansetzen
	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 5	
p_H	6,49	6,51	6,44	6,37	6,30	6,20	15′
	6,49	6,49	6,42	6,36	6,29	6,22	1h
Mittelwert:	6,49	6,50	6,43	6,37	6,30	6,21	

*Tabelle VII*b.

Das Säurebindungsvermögen der zweifach verdünnten Milch.

	Zweifach verdünnte Milch : n/333 HCl						Zeit nach dem Ansetzen
	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 5	
p_H	6,67	6,53	6,37	6,16	5 92	5,66	15′
	6,63	6,51	6,34	6,15	5,92	5,68	1h
Mittelwert:	6,65	6,52	6,36	6,16	5,92	5,67	

Wenn man die beiden Ergebnisse (a) und (b) vergleicht, so ergibt sich folgendes:

Bei unverdünnter Milch: $p_H = 6{,}49$, p_H (1 Volumen Milch + 5 Volumina n/333 HCl) = 6,21, die Differenz der beiden = 0,28.

Bei zweifach verdünnter Milch: $p_H = 6{,}65$, p_H (1 Volumen Milch + 5 Volumina n/333 HCl) = 5,67, die Differenz der beiden = 0,98.

Aus diesen Versuchen erkennt man sehr deutlich, wie stark die Verdünnung das Säurebindungsvermögen der Milch beeinflußt. Um den Gehalt an Eiweiß und Salz der Kuhmilch der Frauenmilch gleich machen zu können, habe ich Kuhmilch mit Wasser auf dreifaches Volumen verdünnt und stellte dann Versuche über das Säurebindungsvermögen an.

*Tabelle VII*c.

Das Säurebindungsvermögen der dreifach verdünnten Kuhmilch.

	Dreifach verdünnte Milch : n/1000 HCl						Zeit nach dem Ansetzen
	1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 5	
p_H	6,76	6,72	6,72	6,64	6,58	—	
	6,77	6,74	6,69	6,65	6,59	6,55	
Mittelwert:	6,76	6,72	6,70	6,64	6,59	6,55	

Wie die Tabelle zeigt, ist das Säurebindungsvermögen der dreifach verdünnten Kuhmilch im Vergleich zu dem der Frauenmilch zwar noch etwas größer, aber im großen und ganzen nahezu gleich.

Wenn man bei unverdünnter Kuhmilch das Säurebindungsvermögen untersuchen will, so muß man drei- bis vierfach konzentriertere HCl-Lösung — n/300 bzw. n/250 HCl — als bei Frauenmilch — n/1000 HCl — benutzen, will man aber an der schon zuerst dreifach verdünnten Milch das Vermögen beobachten, kann man mit ebenso konzentrierter Milch wie bei Frauenmilch arbeiten. Auf diese beiden Versuche gestützt, dürfte wohl das Urteil berechtigt sein, daß das Säurebindungsvermögen der Kuhmilch drei- bis vierfach größer ist als das der Frauenmilch.

5. Einfluß der Temperatur auf die [H'] der ungekochten Kuhmilch.

Es wurde schon erwähnt, daß die [H'] gekochter Milch bei Zimmertemperatur (18° C) 2 Stunden lang fast unverändert bleibt. Bei ungekochter Milch ist die Sache etwas anders. Die [H'] der rohen Milch nimmt beim Stehen an der Luft, besonders bei höherer Temperatur nach und nach zu, und zwar einerseits durch CO_2-Abgabe, andererseits durch Milchsäurebildung (s. Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Der Einfluß der Temperatur auf p_H der ungekochten Milch.

A.

Zeit n. d. Ansetzen in die Elektrode		20—30′	1h	2h	3h	4h	5h
Zimmertemperatur		18°	18°	18,2°	18°	17,2°	17°
Nr. 1	p_H	6,58	6,60	6,60	6,56	6,56	6,56
„ 2		6,58	6,57	6,57	6,56	6,56	6,56
„ 3		6,57	6,57	6,57	6,56	6,56	6,56
Im Mittel:		6,58	6,57	6,58	6,56	6,56	6,56

B.

Zeit n. d. Ansetzen in die Elektrode		20—30′	1h	2h	3h	4h	5h
Temperatur im Thermostaten		27°	30°	30°	30,2°	30°	29,6°
Nr. 1	p_H	6,50	6,40	6,36	6,29	6,22	6,15
„ 2		6,47	6,36	6,32	6,24	6,15	6,11
„ 3		6,48	6,36	6,29	6,19	6,11	6,07
Im Mittel:		6,48	6,37	6,32	6,24	6,16	6,11

Wie aus der Tabelle VIIIa ersichtlich ist, bleibt, wenn die Zimmertemperatur nicht zu hoch ist, das p_H 2 bis 3 Stunden lang fast konstant. Bei höherer Temperatur aber macht sich schon nach einer Stunde eine geringe Vermehrung der [H'] bemerkbar, nachher aber nimmt sie relativ

schnell zu. Man muß also im Sommer die Messung der [H·] der Rohmilch möglichst innerhalb einer Stunde abschließen.

6. Zeitliche Änderung der [H·] der ungekochten Kuhmilch im Eisschrank (0 bis 3° C).

Es schien mir nicht überflüssig, die Frage zu beantworten, ob und wie lange man die Rohmilch im Eisschrank ohne Veränderung der [H·] aufbewahren kann.

Bald nach dem Melken wurde eine Portion der Milch sofort untersucht: $p_H = 6{,}54$. Die andere Portion wurde sofort in den Eisschrank gestellt. Nach 5 Stunden wurde nochmals untersucht: $p_H = 6{,}52$. Die Differenz der beiden Zahlenwerte 0,02 ist unbeträchtlich. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank erfährt die [H·] nur geringe Vermehrung: $p_H = 6{,}46$. Die Resultate finden sich in der Tabelle IX.

Tabelle IX.

Zeitliche Änderung der [H·] der ungekochten Milch im Eisschrank (0 bis 3° C).

Zeit nach dem Melken: Zimmertemperatur bei der Messung		Sofort gemessen 18°	Nach 5stündigem Stehen im Eisschrank gemessen 18°	Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank gemessen 17,5°
Nr. 1	p_H	6,55	6,53	6,48
„ 2		6,51	6,53	6,42
„ 3		6,55	6,53	6,48
„ 4		6,55	6,48	6,47
Im Mittel:		6,54	6,52	6,46

II. Die eigentlichen Versuche.

1. Die Wasserstoffionenkonzentration der normalen Frauenmilch.

Nach der Angabe von *Davidsohn* ist die [H·] der normalen Frauenmilch $p_H = 6{,}58$ bis 7,21, im Mittel 6,97, nach *Aron* p_H = etwa 7,11, nach *Szili* $p_H = 7{,}26$. Nach *Shizume* und *Shirai* ist die [H·] der Milch von Japanerinnen p_H im Maximum = 7,355, im Minimum = 6,99; nach *S. Ohi* p_H im Maximum = 7,36, im Minimum = 6,84. Die von mir untersuchten Milchproben stammten von 46 Personen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle X zusammengestellt.

Aus den erhaltenen Zahlen ergibt sich, daß die [H·] der normalen Frauenmilch von Japanerinnen zwischen p_H 7,0 bis 7,3 liegt, im Mittel $p_H = 7{,}17$ beträgt, was mit den von *Shizume* und *Shirai* erhaltenen Zahlen gut übereinstimmt. Bei der Versuchsnummer 24 — Fall von *H. K.* — maß ich das p_H der Milch 9 Tage hindurch täglich einmal, sie schwankte zwischen 7,12 und 7,25. Man dürfte wohl daraus schließen, daß die [H·] der Milch von Gesunden bei derselben Person fast konstant ist.

Tabelle X.

Die [H'] der Milch gesunder Japanerinnen.

Nr.	Name der Mutter	Alter des Säuglings Monate	Datum des Versuchs 1923	Zimmertemperatur °C	p_H	[H']
1	*T. N.*	10	15. VIII.	34	7,20	$6{,}31 \cdot 10^{-8}$
2	*K. O.*	4	17. VIII.	29	7,03	9,33
3	*F.*	7	16. VIII.	34	7,29	5,13
			18. VIII.	31	7,36	4,37
4	*M.*	5	20. VIII.	30,1	7,08	8,32
5	*S. T.*	9	20. VIII.	30	7,31	4,90
6	*K. T.*	7	21. VIII.	30	7,15	7,08
7	*H. S.*	5	21. VIII.	30,5	7,13	7,41
8	*M. M.*	9	22. VIII.	29,6	7,31	4,90
9	*M. S.*	9	23. VIII.	31,2	7,31	4,90
10	*T. K.*	10	24. VIII.	31,2	7,02	9,55
11	*T. S.*	7	25. VIII.	31	7,18	6,61
12	*K.*	8	—	—	7,22	6,03
			1924			
13	*K. F.*	7	12. V.	24,8	7,08	8,32
14	*H. N.*	4	12. V.	24,8	7,18	6,61
15	*M.*	8	13. V.	24	7,23	5,89
16	*O.*	4	14. V.	23,8	7,09	8,13
17	*S. M.*	1	14. V.	23,8	7,02	9,55
18	*M. O.*	3	22. V.	22,4	7,22	6,03
19	*K. S.*	6	22. V.	22,4	7,06	8,71
20	*A.*	7	23. V.	30	7,24	5,75
21	*N.*	5	23. V.	30	7,24	5,75
22	*J. T.*	5	24. V.	23,5	7,14	7,24
			28. V.	25	7,19	6,46
23	*K. T.*	5	24. VI.	23,5	7,13	7,41
24	*H. K.*	6	28. VI.	25	7,25	5,62
			29. VI.	24—25	7,23	5,89
			29. VI.	24—25	7,25	5,62
			30. VI.	28	7,18	6,61
			30. VI.	28	7,23	5,89
			1. VII.	29,5	7,18	6,76
			3. VII.	26,8	7,12	7,59
			4. VII.	30	7,12	7,59
			6. VII.	30,6	7,18	6,61
25	*K. K.*	6	1. VII.	29,5	7,35	4,47
			3. VII.	29,8	7,24	5,75
			4. VII.	30	7,25	5,62
26	*J.*	3	6. VII.	30,6	7,04	9,12
27	*M. H.*	5	4. VIII.	28,3	7,08	8,32
28	*M. H.*	8	4. VIII.	28,3	7,31	4,90
			5. VIII.	30	7,20	6,31
29	*T. S.*	10	5. VIII.	30	7,38	4,17
30	*T. M.*	6	6. VIII.	28,2	7,04	9,12
31	*T. O.*	8	6. VIII.	28,2	7,26	5,50
32	*J. M.*	2	7. VIII.	29,8	7,13	7,41
33	*F. K.*	8	7. VIII.	29,8	7,24	5,75
34	*T. M.*	8	8. VIII.	31,2	7,16	6,92
35	*M. K.*	5	8. VIII.	31,2	7,39	4,07
36	*S. J.*	8	11. VIII.	31,5	7,23	5,89
37	*M. K.*	10	11. VIII.	31,5	7,25	5,62
38	*R. K.*	2	12. VIII.	31,6	7,03	9,33

Tabelle X (Fortsetzung).

Nr.	Name der Mutter	Alter des Säuglings Monate	Datum des Versuchs 1924	Zimmertemperatur ° C	p_H	[H·]
38	*R. K.*	2	14. VIII.	31,8	7,04	$9{,}12 \cdot 10^{-8}$
39	*J. M.*	4	12. VIII.	31	7,17	6,76
			13. VIII.	33,1	7,02	9,55
40	*F. S.*	24	14. VIII.	31,8	7,19	6,46
41	*T. M.*	2	15. VIII.	29	7,19	6,46
42	*T. M.*	2	15. VIII.	29	7,02	9,55
43	*O.*	15	16. VIII.	29,5	7,31	4,50
44	*R. T.*	5	16. VIII.	29,5	7,04	9,12
			18. VIII.	28,2	7,11	7,76
45	*H. S.*	1	19. VIII.	33	7,11	7,76
46	*T. A.*	8	19. VIII.	33	7,33	4,68

p_H { Maximum . . . . 7,39 / Minimum . . . . 7,02 / Mittelwert 7,17

Anhang: Die [H·] der Milch und die Laktationsperiode.

Es gibt bisher zwei voneinander abweichende Ansichten, nämlich: Während *Vaudin*, *Courant* (6) und *Szili* (7) die Acidität der Milch der früheren Laktationsperiode für höher als die der späteren Dauermilch hielten, nahmen *Kasahara* (8) und *Ohi* dagegen an, daß die Acidität des Colostrums niedriger ist als die der Dauermilch. Ich bin nicht imstande, genauer auf diese Frage einzugehen, weil ich bisher keine Gelegenheit hatte, Colostrum zu untersuchen. Wenn man in der obigen Tabelle die [H·] der Milch aus verschiedener Laktationszeit miteinander vergleicht, so erkennt man, daß die Milch der früheren Laktationszeit im allgemeinen höhere Acidität zeigt als die der späteren.

2. Die Wasserstoffionenkonzentration der Muttermilch bei Säuglingskakke, d. h. Kakkemilch.

Ich habe in den elf Fällen von Muttermilch von Säuglingskakke — kurz als Kakkemilch bezeichnet — 15mal bezüglich der [H·] untersucht. Die Mütter der Säuglingskakkekranken wurden in der Kinderabteilung des Krankenhauses „Senkyo-Byoin" in Tokio aufgenommen und von dem Abteilungsvorsteher, Prof. *K. Ohta*, diagnostiziert; ein Teil jedoch wurde in der Kinderklinik der Universität zu Kanazawa vom damaligen Leiter der Klinik, Prof. *K. Tsuda*, diagnostiziert.

Wie Tabelle XI zeigt, liegt die [H·] der Kakkemilch zwischen p_H 7,0 bis 7,3, im Mittel 7,19. Die Zahlen zeigen gar keine Abweichung von denen der normalen Frauenmilch; man darf daraus wohl mit Recht schließen, daß zwischen der [H·] der Kakkemilch und normalen Milch kein Unterschied besteht. Im Laufe der Laktationszeit scheint auch hier die [H·] allmählich sich zu vermindern, wie bei der normalen Frauenmilch.

Tabelle XI.

Die [H'] der Kakkemilch.

Nr.	Name der Mutter	Alter des Säuglings Monate	Datum des Versuchs 1923	Zimmertemperatur °C	p_H	[H']
1	*T. A.*	4	15. VIII.	34	7,10	$7{,}94 \cdot 10^{-8}$
			16. VIII.	34	7,14	7,24
			20. VIII.	30,1	7,14	7,24
2	*J. S.*	6	16. VIII.	34	7,21	6,17
3	*T. K.*	8	17. VIII.	29	7,26	5,50
			20. VIII.	30	7,14	7,24
			23. VIII.	31,2	7,21	6,17
4	*Y. Y.*	2	18. VIII.	31	7,28	5,25
5	*K. A.*	5	21. VIII.	30	7,20	6,31
6	*M. Y.*	8	23. VIII.	29,6	7,26	5,50
7	*Y. H.*	7	24. VIII.	31,2	7,29	5,13
8	*H. S.*	12	25. VIII. 1924	31,0	7,21	6,17
9	*S. S.*	2	10. VIII.	22	7,09	8,13
10	*T. T.*	6	13. VIII. 1923	22	7,33	4,68
11	*S. K.*	4	11. VIII.	32	7,07	8,50

3. Das Säurebindungsvermögen der Kakkemilch bzw. der normalen Frauenmilch.

Wie schon erwähnt, haben *Shizume* und *Shirai* hervorgehoben, daß zwischen der [H'] der Kakkemilch und der normalen Milch zwar kein merklicher Unterschied vorhanden ist, daß aber das Säurebindungsvermögen der ersteren deutlich geringer sei als das der letzteren. Kurz danach hat *S. Ohi* sich mit derselben Frage beschäftigt und mitgeteilt, daß die Kakkemilch und die normale Frauenmilch nicht nur in bezug auf die [H'], sondern auch auf das Säurebindungsvermögen keinen Unterschied zeigen. Ich habe mich auch bemüht, diesen Punkt klarzustellen. Selbstverständlich habe ich die Versuche mit größter Sorgfalt ausgeführt.

Zur Untersuchung des Säurebindungsvermögens der Milch hielt ich mich an die Angabe von *Shizume* und *Shirai*, um einen möglichst genauen Vergleich machen zu können. In sechs Reagenzgläser aus hartem Glas wird je ein Teil Milch gegossen und mit n/1000 HCl versetzt wie in folgender Tabelle; alle Röhrchen werden geschüttelt und im V-Rohr von *Michaelis* die [H'] nach der Gaskettenmethode ermittelt.

Reagensglas:	1	2	3	4	5	6
Milch	1 Teil	1 Teil	1 Teil	1 Teil	1 Teil	1 Teil
n/1000 HCl-Lösg.	0	1 „	2 Teile	3 Teile	4 Teile	5 Teile

Ich habe im ganzen 13 Messungen von elf Kakkekranken ausgeführt. Als Kontrolle habe ich jedesmal frische Normalmilch unter ganz denselben Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen XII und XIII zusammengestellt.

Tabelle XII.

Nr.	Name der Mutter	Datum des Versuch 1923	Alter des Säuglings Monate	Milch : n/1000 HCl 1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 5	1 : 6	Zimmertemperatur °C
1	*T. A.* (Kakke)	15. VIII.	4	7,10	7,20	7,07	6,93	6,79	6,67	—	34
	T. N. (Kontrolle)		10	7,20	7,20	7,06	6,86	6,79	6,50	—	
2	*J. S.* (Kakke)	16. VIII.	6	7,21	7,22	7,08	6,90	6,81	6,70	—	34
	J. F. (Kontrolle)		7	7,29	—	—	7,12	7,02	6,95	—	
3	*T. K.* (Kakke)	17. VIII.	8	7,26	—	6,99	6,85	6,59	6,49	6,38	29
	K. O. (Kontrolle)		4	7,03	7,09	6,87	6,71	—	6,49	—	
4	*T. K.* (Kakke)	20. VIII.	8	7,14	7,16	7,01	6,78	6,66	6,52	6,40	30
	S. T. (Kontrolle		9	7,31	7,42	7,31	7,11	6,95	6,71	—	
5	*T. K.* (Kakke)	23. VIII.	8	7,21	—	—	—	6,54	6,40	6,20	31,2
	M. S. (Kontrolle)		9	7,31	7,28	7,07	6,83	6,63	6,45	6,39	
6	*J. J.* (Kakke)	18. VIII.	2	7,28	7,33	7,18	7,07	6,87	6,76	6,63	31
	J. F. (Kontrolle)		7	7,36	7,43	7,32	7,22	7,05	6,96	6,79	
7	*K. A.* (Kakke)	21. VIII.	5	7,20	7,30	7,13	6,99	6,74	6,50	—	30
	K. T. (Kontrolle)		7	7,15	7,24	6,99	6,75	6,51	6,41	—	
8	*M. J.* (Kakke)	22. VIII.	8	7,26	7,34	7,15	6,93	6,81	6,74	6,56	29,6
	M. M. (Kontrolle)		9	7,31	—	7,09	6,93	6,77	6,72	6,57	
9	*J. H.* (Kakke)	24. VIII.	7	7,29	7,26	7,21	7,13	6,98	6,89	—	31,2
	T. K. Kontrolle)		10	7,02	7,10	—	6,95	6,82	6,73	6,62	
10	*H. S.* (Kakke)	25. VIII.	12	7,21	7,32	7,10	7,01	6,90	6,80	6,61	31
	T. S. (Kontrolle)		7	7,18	7,31	7,28	7,07	7,00	6,90	6,81	
		1924									
11	*S. S.* (Kakke)	10. VI.	2	7,09	7,10	7,03	6,86	6,73	6,68	—	22
	K. F. (Kontrolle)		7	7,08	7,11	6,91	6,72	6,64	6,50	—	
12	*T. T.* (Kakke)	13. VII.	6	7,33	7,30	7,20	7,10	6,95	6,78	—	22
	J. M. (Kontrolle)		2	7,02	7,05	6,95	6,84	6,73	6,64	—	
13	*S. K.* (Kakke)		4	7,07	7,05	7,04	6,99	6,90	6,77	—	32
	K. (Kontrolle)		8	7,22	7,28	7,19	7,15	6,94	6,78	—	

Tabelle XIII.

Nr.	Name der Mutter	Milch : n/1000 HCl					
		1 : 0	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 5
1	*T. A.* (Kakke)	$7{,}9 \cdot 10^{-8}$	$6{,}3 \cdot 10^{-8}$	$8{,}5 \cdot 10^{-8}$	$11{,}8 \cdot 10^{-8}$	$16{,}2 \cdot 10^{-8}$	$21{,}4 \cdot 10^{-8}$
	T. N. (Kontrolle)	6,3	6,3	8,7	13,8	16,2	31,6
2	*J. S.* (Kakke)	6,2	6,0	8,3	12,6	15,5	20,0
	J. F. (Kontrolle)	5,1	—	—	7,6	9,6	11,2
3	*T. K.* (Kakke)	5,5	—	10,2	14,1	25,7	32,4
	K. O. (Kontrolle)	9,3	8,1	13,5	19,5	—	32,4
4	*T. K.* (Kakke)	7,2	6,9	9,8	16,6	21,9	30,2
	S. T (Kontrolle)	4,9	3,8	4,9	7,8	11,2	19,5
5	*T. K* (Kakke)	6,2	—	—	—	28,8	39,8
	M. S. (Kontrolle)	4,9	5,3	8,5	14,8	23,4	35,5
6	*Y. Y.* (Kakke)	5,3	4,7	6,6	8,5	13,5	17,4
	Y. F. (Kontrolle)	4,4	3,7	4,8	6,0	8,9	11,0
7	*K. A.* (Kakke)	6,8	5,0	7,4	10,2	18,2	31,6
	K. T. (Kontrolle)	7,1	5,8	10,2	17,8	31,0	38,9
8	*M. Y.* (Kakke)	5,5	4,6	7,1	11,8	15,5	18,2
	M. M. (Kontrolle)	4,9	—	8,1	11,8	17,0	19,1
9	*Y. H.* (Kakke)	5,1	5,5	6,2	7,4	10,5	12,9
	T. K. (Kontrolle)	9,6	7,9	—	11,2	15,2	18,6
10	*H. S.* (Kakke)	6,2	4,8	7,9	9,8	12,6	15,9
	T. S. (Kontrolle)	6,6	4,9	5,3	8,5	10,0	12,6
11	*S. S.* (Kakke)	8,1	7,9	9,3	13,8	18,6	20,9
	K. F. (Kontrolle)	8,3	7,8	12,3	19,1	22,9	31,6
12	*T. T.* (Kakke)	4,7	5,0	6,3	7,9	11,2	16,6
	J. M. (Kontrolle)	9,6	8,9	11,2	14,5	18,6	22,9
13	*S. K.* (Kakke)	8,5	8,9	9,1	10,2	12,6	17,0
	K. (Kontrolle)	6,0	5,3	6,5	7,1	11,5	16,6

Aus den Tabellen XII und XIII geht hervor:

1. Setzt man zu der Normal- oder Kakkemilch das gleiche Volumen n/1000 HCl hinzu, so zeigt sich eine ganz schwache aber unzweifelhafte Verminderung der [H']. Beim Beimischen von n/1000 HCl in steigender Menge zu der Milch vermehrt sich die [H'] allmählich.

2. Versetzt man die Normalmilch mit dem fünffachen Volumen n/1000 HCl, so zeigt sich $[H'] = 11 \cdot 10^{-8}$ bis $38{,}9 \cdot 10^{-8}$ oder $r_H = 6{,}91$ bis 6,41.

3. Versetzt man die Kakkemilch mit dem fünffachen Volumen n/1000 HCl, so zeigt sich $[H'] = 12{,}9 \cdot 10^{-8}$ bis $39{,}8 \cdot 10^{-8}$ oder $r_H = 6{,}89$ bis 6,40.

Die beiden Werte, die bei der normalen bzw. Kakkemilch gefunden wurden, sind fast ganz übereinstimmend.

4. Nach dem Grade des Säurebindungsvermögens der beiden genannten Milcharten können wir diese in drei Gruppen einteilen.

a) Bei den Milchproben von Kakke 2, 4 und 6 zeigt sich mehr oder weniger Verminderung des Säurebindungsvermögens im Vergleich zur normalen.

b) Das Säurebindungsvermögen bei den Milchproben von Kakke 1, 7 und 11 steigt gegen das der normalen.

c) Das Säurebindungsvermögen der beiden Milchproben 3, 5, 8, 9, 10, 12, 13 ist beinahe gleich.

Gemäß den genannten Versuchsreihen können wir mit Recht sagen, daß das Säurebindungsvermögen der Kakkemilch im Vergleich zu dem der normalen Milch keinen nennenswerten Unterschied zeigt.

Zusammenfassung.

1. Das p_H der käuflichen, gemischten und gekochten Kuhmilch beträgt im Maximum = 6,64, im Minimum = 6,52, im Mittel = 6,59.

2. Das Säurebindungsvermögen der Kuhmilch ist drei- bis vierfach größer als das der Frauenmilch.

3. Durch einfache Verdünnung der Milch mit destilliertem Wasser sinkt die Acidität und nähert sich die Reaktion dem neutralen Punkte im wahren Sinne.

4. Da die [H·] der ungekochten Milch im Hochsommer, bei 27 bis 30° C, relativ schnell wächst, muß man möglichst schnell untersuchen.

5. Das p_H der ungekochten Milch bleibt im Eisschrank (0 bis 3° C) mehrere Stunden lang fast unverändert.

6. Das p_H der normalen Milch von japanischen Frauen liegt zwischen 7,0 bis 7,3 und beträgt im Mittel 7,17.

7. Der Wert des p_H der Milch scheint in der anfänglichen Laktationsperiode etwas größer zu sein als in der späteren.

8. Das p_H der Muttermilch bei Säuglingskakke beträgt im Mittel 7,19, d. h. dieser Wert weicht von dem der normalen Muttermilch kaum ab.

9. Das Säurebindungsvermögen der Muttermilch bei Säuglingskakke im Vergleich zu dem der normalen zeigt keine Abweichung.

Zum Schluß erfülle ich die angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. *K. Suto*, für die Anregung und Anleitung zu dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Literatur.

1) *S. Shizume* und *B. Shirai*, Ikaijiho, japanisch, Nr. 1429, 1921. — 2) *S. Ohi*, Jikwazasshi, japanisch, Nr. 278, S. 1, 1923. — 3) *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 1914. — 4) *H. Davidsohn*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **9**, 11, 1913. — 5) *H. Aron*, Jahrb. f. Kinderheilk. **79**, 288, 1914. — 6) *G. Courant*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **50**, 109, 1891. — 7) *A. Szili*, diese Zeitschr. **84**, 194, 1917. — 8) *M. Kasahara*, Jikwazasshi, japanisch. Nr. 151, 1912.

Bemerkungen zu der Arbeit von A. Grevenstuk und E. Laqueur: Glykogengehalt der Leber unter Insulinwirkung. II[1]).

Von

E. Frank, M. Nothmann und E. Hartmann.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Breslau.)

(Eingegangen am 31. Juli 1926.)

Grevenstuk und *Laqueur* bestätigen mittels der Methode wiederholter Entnahme kleiner Leberstückchen unseren Befund, daß Insulin in sehr kleinen Dosen beim hungernden Kaninchen eine Glykogenvermehrung in der Leber herbeiführt, aber sie beziehen dieses Ergebnis nicht auf das Inkret als solches, sondern auf die verdünnte Salzsäure, in der es gelöst ist. Sie fanden nämlich in Kontrollversuchen, in denen sie lediglich 1 ccm n/100 HCl pro Tier oder pro Kilogramm Tier, d. h. die Menge, welche der von ihnen verwendeten Insulindosis entspricht, einspritzten, ebenfalls Erhöhung des Glykogengehalts, die „zwar nur geringfügig, in der Größenanordnung, aber durchaus übereinstimmend mit der von Insulintieren sei".

Die Tatsache der Glykogenanreicherung in der Leber des Normaltieres ist so wichtig für das Verständnis der Insulinwirkung, daß wir an dem von autoritativer Seite geäußerten Zweifel nicht stillschweigend vorbeigehen können.

Die Glykogenvermehrung, welche die Autoren in sämtlichen Versuchen — mit Insulin und mit HCl — finden, ist, wie sie selbst sagen, geringfügig. sie ist, wie wir hinzufügen möchten, so geringfügig, daß wir auf Grund derartiger Versuchsergebnisse niemals den Schluß zu ziehen gewagt hätten, daß durch Insulin auch beim Normaltier eine Glykogenspeicherung erzwungen werden kann. Nur in einem Versuche ist ein Wert über 1 Proz. (1,2 Proz.) erreicht, und nur in zwei Versuchen insgesamt würden wir von einem nennenswerten Plus sprechen (0,27 bis 1,2 Proz; 0,34 bis 0,77 Proz.). In unseren eigenen sieben Experimenten liegt nur einmal der Glykogenwert unter 1 Proz. (0,6 Proz.); dagegen viermal über 1,8 Proz. (höchster Wert 2,8 Proz., in einer neuen Versuchsreihe sogar 3,8 Proz.). Auf Grund der Versuche von *Grevenstuk* und *Laqueur* ist der mittlere Glykogengehalt der Leber von 24 Tieren[2]) nach viertägigem Hungern 0,16 Proz. (er schwankt meist zwischen 0,1 und 0,25 Proz.); wir sehen also, daß in unseren Versuchen eine recht beträchtliche (mikroskopisch ja auch ohne weiteres in

---

[1]) Diese Zeitschr. **178**.

[2]) Die beiden Tiere ihrer Reihe, die möglicherweise nicht vollständig gehungert haben, sind nicht berücksichtigt.

die Augen fallende) Anreicherung stattgefunden hat. Wir möchten es für sehr unwahrscheinlich halten, daß 1 ccm n/100 HCl derartiges bewirken könne; aus den Zahlen von *Grevenstuk* und *Laqueur* geht es jedenfalls nicht hervor, hier ist maximal ein Wert von 0,47 Proz., durchschnittlich (nach 2 Stunden) ein solcher von 0,21 Proz. erreicht[1]). Im übrigen spielt die Säure — und das ist das Wichtigste — in unseren Versuchen gar keine Rolle. Denn wir haben, um $^1/_{10}$ bis $^2/_{10}$ klinische Einheiten zu applizieren, ½ bis 1 ccm einer mit physiologischer Kochsalzlösung auf das Hundertfache verdünnten Lösung des Originalinsulins eingespritzt. Zum Überfluß haben wir das p_H der Originallösung gemessen und kolorimetrisch einen Wert von 5,4 bis 5,6, elektromotorisch einen Wert von 6,019 festgestellt.

Worauf könnte wohl der Unterschied der Ausschläge in der Versuchsreihe von *Grevenstuk* und *Laqueur* und der unserigen beruhen? Die holländischen Autoren haben sich nach unserer Angabe einer Insulindosis von $^1/_{10}$ klinischer Einheit pro Kilogramm oder gar pro Tier bedient. Ihre Tiere mußten aber wohl während der Versuchsdauer öfters aufgebunden werden und waren mehrfach einem operativen Eingriff — der Leberentnahme — ausgesetzt, alles Maßnahmen, die, wie die Autoren selbst nachgewiesen haben, glykogenmobilisierend wirken; für diesen Fall erscheint die gewählte Insulinmenge zu klein; das ist daraus zu ersehen daß der Blutzucker während der Versuchszeit *oft erheblich ansteigt* oder gleichbleibt, nur gelegentlich vorübergehend einmal ein wenig absinkt.

Es geht vielleicht aus der „kurzen wissenschaftlichen Mitteilung", die wir bis jetzt nur über unsere Experimente gemacht haben, nicht genügend deutlich hervor, daß wir jedesmal bestrebt waren, eine starke Senkung des Blutzuckers zu erzielen, ohne daß jedoch Krämpfe auftraten. Nur eine Glykogenbestimmung bei tiefem Stande des Blutzuckers schien uns überhaupt von Wert, und nur solche Tiere wurden ausgewählt, bei denen dieser tatsächlich erreicht wurde. Es sei zur Veranschaulichung ein charakteristisches Protokoll wiedergegeben, das wir, um mißverständlichen Deutungen vorzubeugen, trotz der Kürze unserer vorläufigen Mitteilung daselbst zu bringen nicht hätten unterlassen sollen.

Protokoll.

Kaninchen 83; hungert seit 19. März 1925, 8 Uhr vormittags.

23. März. Gewicht 950 g.
8 Uhr 30 Minuten Blutzucker 0,099,
8 „ 45 „ $^1/_{10}$ Insulineinheiten, *Wellcome*, subkutan,
10 „ 15 „ Blutzucker 0,048, keine Krämpfe,
11 „ 20 „ „ 0,048, „ „
12 „ 20 „ „ 0,066, „ „
12 „ 40 „ Tötung durch Nackenschlag,
Lebergewicht 25 g, Glykogengehalt 2,06 Proz.

In unseren Versuchen erwies sich $^1/_{10}$ klinische Einheit als passende Dosis, aber unsere Tiere waren weder gefesselt, noch einem operativen Trauma ausgesetzt, d. h. es wurde jeder glykogenmobilisierende Einfluß

[1]) Es ist auffällig, daß Säure überhaupt Glykogenansatz machen soll, nach den übereinstimmenden Erfahrungen zahlreicher Autoren (*Elias*, *Gottschalk* und *Pohle*) gehört sie zu den glykogenmobilisierenden Faktoren.

peinlich vermieden. Diesen Punkt haben *Grevenstuk* und *Laqueur* anscheinend übersehen; die Blutzuckerkurve ihrer Tiere erweist, daß glykogenabbauende Tendenzen am Werke waren, denen gegenüber die kleine Insulingabe ziemlich machtlos war. Deutliche Ausschläge waren bei ihrer Versuchsanordnung von vornherein nicht mit großer Wahrscheinlichkeit zu erwarten. Entnahme von Leberstückchen in kurzen Intervallen ist uns deshalb immer sehr unzweckmäßig erschienen. Die einmalige Bestimmung im Vergleich mit einem an möglichst vielen Tieren, die gleich lange hungern, ermittelten Normalwert scheint uns brauchbarere Resultate zu liefern. Am ehesten könnte man noch so vorgehen, daß man nach drei Hungertagen ein Leberstückchen entnimmt und den Versuch mit Insulin 24 Stunden später anstellt.

Das Verhalten des Farbstoffs im Blute bei entmilzten Hunden.

Von

G. Farkas und H. Tangl.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 31. Juli 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die Ausscheidung der in das Blut injizierten Stoffe erfolgt verschieden schnell und hängt zunächst von ihrer kristalloiden und kolloidalen Natur ab.

Die Kristalloide wandern nach den grundlegenden Versuchen von *Frey* (1919) durch Diffusion schnell aus dem Blute in das benachbarte Gewebe, bis es zu einem Konzentrationsausgleich kommt. Von diesem Zeitpunkt an, wo die Konzentration im Blute und in dem Gewebe gleich geworden ist, wird der Farbstoff durch die Nierentätigkeit langsam im Blute zum Verschwinden gebracht. Die kolloidalen Stoffe verlassen hingegen viel langsamer die Gefäße, wie dies *Starling* (1894, 1899), *Asher* (1908), *Magnus* (1900) in ihren Arbeiten hervorheben. Die Ausscheidungsgeschwindigkeit der Kolloide wird durch mehrere ihrer Eigenschaften bedingt. Vorerst spielt die chemische Struktur der Stoffe eine große Rolle. Basische Farbstoffe wandern nämlich viel schneller aus dem Blute als saure. Nach *Krebs* und *Wittgestein* (1926) hängt dies mit der Adsorptionswirkung des Zellprotoplasmas bzw. des Zelleiweißes zusammen, da durch sie basische Stoffe im allgemeinen gut absorbiert werden, saure dagegen nur negativ. Da ferner die Zellen wasserärmer sind als das Blut, enthalten sie mehr Adsorbenzien und reißen hierdurch die gut adsorbierbaren basischen Stoffe schnell an sich, während die sauren, die nur negativ adsorbiert werden, länger im Blute verbleiben. Bei dem Auswandern der Farbstoffe spielt auch die Wärme eine Rolle, wie dies *Okuneff* (1924) feststellte, als er darauf hinwies, daß der injizierte Farbstoff an den erwärmten Stellen sich viel mehr ansammelt als an den unerwärmten. Auch der Dispersitätsgrad der Farbstoffe ist von Bedeutung, allerdings verschwinden die Carbinole (Wasserblau, Lichtgrün, Säurefuchsin), die im Blute farblos kreisen, immer langsamer aus dem Blute als andere Farbstoffe, die sonst den gleichen Dis-

persitätsgrad aufweisen. *Krebs* und *Wittgestein* bestimmten in einer ihrer Arbeiten (1926) das Verhalten von 18 Teerfarbstoffen im Blute von Hunden. Sie fanden, daß Fuchsin und Safranin am schnellsten, Trypanblau und Wasserblau am spätesten aus dem Blute verschwinden. Dies stimmt sehr gut mit dem schon früher Erwähnten überein, daß nämlich die basischen Stoffe schnell aus dem Blute ausscheiden.

Okuneff (1924) untersuchte unter anderem auch das Verhalten von Farbstoff im Blute bei der Ausschaltung großer Gebiete des retikuloendothelialen Systems durch das Unterbinden größerer Gefäße. Bei der Unterbindung der Aorta abdominalis und in einem anderen Falle der Art. mesenterica superior fand er, daß tatsächlich eine größere Verlangsamung der Farbstoffausscheidung eingetreten ist, als eine Folge des Ausfallens der Endothelflächen. Auch nach Nephrektomie fand er einen Unterschied in der Farbstoffauswanderung aus dem Blute, indem der Farbstoff anfangs schneller, später langsamer aus dem Blute verschwand. Hierin erblickt er einen Beweis dafür, daß der Farbstoff zuerst gegen das Gewebe das Blut verläßt und erst später langsam durch die Nieren ausgeschieden wird.

Bekanntlich haben *Mac Nee* und *Landau* (1914) die Zellarten, durch die in die Blutbahn injizierte Farbstoffe auffallend gut adsorbiert werden, in das Retikuloendothelsystem zusammengefaßt. Hierher gehören nach ihnen die Zellen der Lymphknoten, der Milz, des Knochenmarks, der Leber und der Nebennieren. Seit kurzem rechnet man nach *Lubarsch* (1921) auch die Retikuloendothelien des Thymus hierher. In diesem System spielen wahrscheinlich Milz, Leber und Knochenmark mit ihren Zellen eine ganz hervorragende Rolle. Dies hatte uns auch zur Untersuchung der Frage geführt, eine wie große Rolle die Milz in diesem System spielt, d. h. wie sich das Verhalten der Farbstoffe im Blute ändert, wenn die Milz entfernt wird.

Methodik.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir Hunde, in deren Blutbahn wir 2proz. Trypanlösung spritzten. Wir wählten Trypanblau, weil es einen Farbstoff darstellt, der nach *Krebs* und *Wittgestein* am längsten im Blute verweilt. Bei der Dosierung führte uns das Prinzip, daß wir pro Kilogramm nicht mehr als 1 cg Farbstoff einführten. Nach der Verabreichung des Farbstoffs entnahmen wir den Tieren nach 5, 30 Minuten und 1, 4, 7, 24 Stunden Blut. Das Blut gewannen wir direkt aus dem Herzen. Das Blut wurde mit einer kleinen Menge einer Lösung von Natriumoxalat vermischt und daraus das Plasma durch Zentrifugieren gewonnen. Die Konzentration der Farbstoffmenge wurde dann in dem *Autenrieth*schen Kolorimeter bestimmt, wo wir als Standardlösung eine 1 : 5000 Trypanblaulösung verwendeten, die wir nach dem Vorschlag von *Okuneff* noch mit einer ½proz. Gelatinelösung versetzten. Aus den erhaltenen Werten wurde die Menge des Farbstoffs unter Zuhilfenahme einer Eichungskurve berechnet.

Bei jedem Hunde wurde zuerst unter normalen Verhältnissen die Farbstoffausscheidung untersucht, dann wurde die Milz entfernt, und erst 2 Wochen nach der Operation wiederholten wir den Farbstoffversuch.

Erster Versuch.

Hund, Männchen, 12 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde an 13. April 1926 ausgeführt. Die Operation war am 17. April 1926. Die weiteren Farbenausscheidungsversuche waren am 2. Mai und 14. Mai 1926. Bei dem ersten Versuch gaben wir 6 ccm von der 2proz. Trypanblaulösung, bei den letzteren zwei 5 ccm, weil der Hund durch die Operation 2 kg von seinem Gewicht verloren hat.

Im Versuch vor der Operation fanden wir

nach 5 Minuten nach der Injektion 70 Proz. der eingeführten Farbenmenge
„ 30 „ „ „ „ 65 „ „ „ „
„ 1 Stunde „ „ „ 47 „ „ „ „
„ 4 Stunden „ „ „ 26 „ „ „ „
„ 7 „ „ „ „ 16 „ „ „ „

Bei demselben Versuchstier nach der Operation

nach 30 Minuten nach der Injektion 77 Proz. in dem ersten und 81 Proz. in dem zweiten Falle der eingeführten Farbenmenge,

„ 1 Stunde nach der Injektion 58 Proz. in dem ersten und 59 Proz. in dem zweiten Falle der eingeführten Farbenmenge,

„ 4 Stunden nach der Injektion 57 Proz. in dem ersten und 52 Proz. in dem zweiten Falle der eingeführten Farbenmenge,

„ 7 „ nach der Injektion 37 Proz. in dem ersten und 24 Proz. in dem zweiten Falle der eingeführten Farbenmenge.

Die erhaltenen Daten, wiedergegeben durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

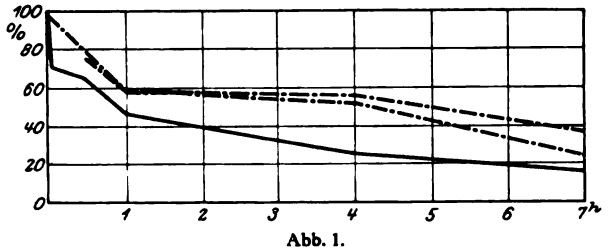


Abb. 1.

Zweiter Versuch.

Hund, Männchen, 8½ kg. Erster Farbenausscheidungsversuch wurde am 15. April 1926 ausgeführt. Die Operation war am 21. Mai 1926. Der zweite Farbenausscheidungsversuch wurde am 5. Mai vollbracht. Im ersten Versuch gaben wir 4,5 ccm von der 2proz. Trypanblaulösung, im zweiten 4 ccm, da das Versuchstier durch die Operation ½ kg von seinem Gewicht verloren hat.

Im Versuch vor der Operation fanden wir

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	58	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30	„	„	„	„	50	„	„	„	„
„	1	Stunde	„	„	„	45	„	„	„	„
„	4	Stunden	„	„	„	26	„	„	„	„
„	7	„	„	„	„	18	„	„	„	„
„	24	„	„	„	„	8	„	„	„	„

Bei demselben Versuchstier nach der Operation

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	98	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30	„	„	„	„	79	„	„	„	„
„	1	Stunde	„	„	„	58	„	„	„	„
„	4	Stunden	„	„	„	53	„	„	„	„
„	7	„	„	„	„	34	„	„	„	„

Die erhaltenen Daten, durch ein Graphikon anschaulicher gemacht, zeigen das Folgende:

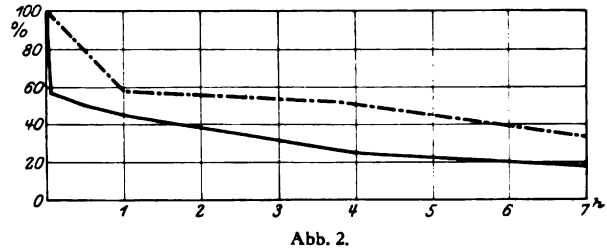


Abb. 2.

Dritter Versuch.

Hund, Männchen, 12 kg. Der erste Farbenausscheidungsversuch wurde am 26. April 1926 ausgeführt. Die Operation war am 30. April 1926. Der zweite Farbenausscheidungsversuch wurde am 20. Mai 1926 ausgeführt. Im ersten Versuch gaben wir 6 ccm von der 2proz. Trypanblaulösung, im zweiten 5,5 ccm, da der Hund durch die Operation 1 kg von seinem Gewicht verloren hat.

Bei dem Versuch vor der Operation fanden wir

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	53	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30	„	„	„	„	48	„	„	„	„
„	1	Stunde	„	„	„	44	„	„	„	„
„	4	Stunden	„	„	„	29	„	„	„	„
„	7	„	„	„	„	18	„	„	„	„
„	24	„	„	„	„	11	„	„	„	„

Bei demselben Versuchstier nach der Operation

nach	5	Minuten	nach	der	Injektion	99	Proz.	der	eingeführten	Farbenmenge
„	30	„	„	„	„	77	„	„	„	„
„	1	Stunde	„	„	„	56	„	„	„	„
„	4	Stunden	„	„	„	51	„	„	„	„
„	7	„	„	„	„	31	„	„	„	„

Die erhaltenen Daten, anschaulicher gemacht durch ein Graphikon, zeigen das Folgende:

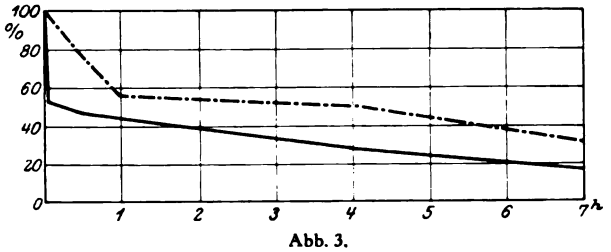


Abb. 3.

Wie aus den Daten und Abbildungen ersichtlich ist, verschwindet der Farbstoff viel langsamer aus dem Blute, wenn die Milz entfernt worden war.

Zusammenfassung.

Bei entmilzten Hunden wird der in die Blutbahn injizierte Farbstoff viel langsamer ausgeschieden, als bei normalen Tieren. Dies ist ein Beweis für die hervorragende Rolle, die die Milz im retikuloendothelialen System spielt.

Literatur.

Frey, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **177**, 1919. — *Starling*, Journ. of Physiol. 1894, Nr. 16 und 1899, Nr. 24. — *Asher*, diese Zeitschr. **14**, 1908. — *Magnus*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **42**, 44, 1900. — *Krebs* und *Wittgestein*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **212**, 1926. — *Okuneff*, ebendaselbst **204**, 1924. — *Derselbe*, ebendaselbst **201**, 1923. — *Landau* und *Mac Nee*, Zieglers Beitr. 1914. — *Lubarsch*, Berl. med. Ges. 1921.

Analytische Mitteilungen. V.

Von

Ludwig Pincussen.

Über die nephelometrische Bestimmung der Phosphate.

Von

Franz Juliusburger.

(Aus der biologisch-chemischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 2. August 1926.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die nephelometrische Bestimmung der Phosphate im Blute gibt nach unseren Erfahrungen und bei genauer Innehaltung des Vorgehens, das in der „Mikromethodik" geschildert ist, durchaus gute Resultate. Die Methode besteht bekanntlich in der Erzeugung einer Trübung in den durch Veraschung gewonnenen Phosphatlösungen mit Hilfe des Molybdän-Strychninreagens (*Kleinmann*). Da aber gelegentlich, besonders bei Anwendung des Verfahrens von weniger Geübten zum Teil nicht unerhebliche Differenzen auftraten, so wurde versucht, die Bedingungen noch einmal genau zu präzisieren und zugleich zu versuchen, ob die oder jene Fehlerquelle nicht vermieden werden könnte.

Als Fehlerquellen kamen nach unseren bisherigen Erfahrungen vor allen Dingen zwei in Betracht: 1. Die Acidität der Lösung vor dem Zusatz des Reagens, die augenscheinlich die Ausbildung der Trübung stark beeinflußt, und 2. eine Veränderung der Trübung bei längerem Stehen.

Es wurde zunächst die erste Bedingung geprüft. Zu Phosphatlösungen gleichen Gehalts — es wurde hierzu die gebrauchsfertige Phosphorsäurestandardlösung gewählt, die in 5 ccm 0,03 mg P_2O_5 enthält — wurden in ganz der gleichen Weise wie im allgemeinen für die Phosphatbestimmung üblich, Wasser und darauf wechselnde Mengen von Salpetersäure in einem 50-ccm-Meßkölbchen zugefügt, so daß die Gesamtmenge der Lösung ungefähr 45 ccm betrug. Die Salpetersäure wurde genau aus einem Teile konzentrierter Salpetersäure, spezifisches Gewicht 1,40, und zwei Teilen Wasser gemischt. Das Reagens wurde darauf in Mengen von 2 ccm zugegeben, bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und vermischt genau 20 Minuten stehengelassen. Als Vergleich diente eine Phosphatlösung, zu der 5 ccm Salpetersäure zugefügt

waren. Die Kurve Abb. 1 zeigt sehr deutlich, daß die unter diesen Umständen erhaltene Trübung bei Zusatz steigender Mengen bis 5 ccm einem Maximum zustrebt, um dann sehr schnell zu fallen, so daß bei einem Zusatz von 7 ccm Salpetersäure die Trübung überhaupt ausbleibt. Es ergibt sich also, daß die erforderliche Salpetersäure sehr genau mit einer Pipette abgemessen werden muß, da schon ein geringer Überschuß zu einer starken Verminderung der Trübung führt. Es ergibt sich des weiteren, daß die Neutralisation der veraschten Flüssigkeit bei der Phosphatbestimmung sehr sorgfältig ausgeführt werden muß; ist auch eine geringe Alkalisierung nicht so gefährlich, da die Kurve bei etwas geringerem Säurezusatz nur wenig fällt, so empfiehlt sich doch dringend ein möglichst genaues Arbeiten.

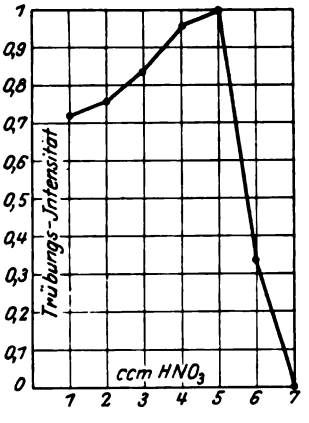


Abb. 1.

Die zweite, heiklere Frage ist die Veränderung der Trübung bei längerem Stehen. Während es sich in allen Versuchen zeigte, daß gleich hergestellte und gleich lange stehende Lösungen dieselbe Trübungsintensität besitzen, ergab sich sehr deutlich eine Zunahme der Trübung bei längerem Stehen, die besonders in der ersten Zeit recht erheblich ist. Zur Prüfung wurden auf gleiche Weise hergestellte Ver-

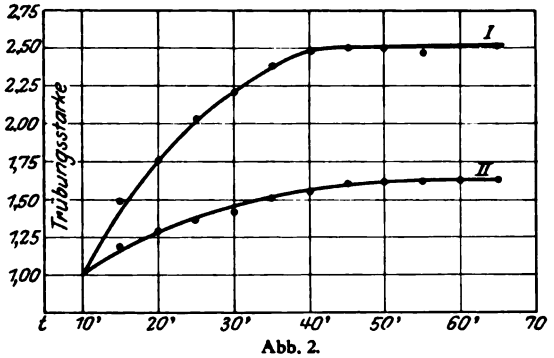


Abb. 2.

suchslösungen mit einer anderen, stets frisch hergestellten verglichen, welche eine bestimmte Zeit, 10, 12 oder 20 Minuten, gestanden hatte, während die anderen Lösungen gewisse Zeit vor dieser angesetzt wurden, so daß sie längere Zeit standen. Von diesen Versuchen sei nur einer erwähnt, bei welchem als Testlösung eine solche Mischung diente, die beim Nephelometrieren 10 Minuten alt war, während man die anderen 15 bis 65 Minuten stehen ließ. Kurve Abb. 2 gibt die Ergebnisse

dieser Versuche; es erhellt aus ihr sehr deutlich, daß unter den angegebenen Bedingungen die Trübungsstärke bis zu 40 Minuten mehr oder weniger steil zunimmt, daß erst mit ungefähr 40 bis 45 Minuten ein Gleichbleiben erreicht wird. Im übrigen ändern sich diese Verhältnisse, wie auch die Kurve zeigt, quantitativ in gewissen Grenzen nach den Versuchsbedingungen, Säurezusatz usw. Unter genauer Innehaltung der Versuchsbedingungen verlaufen dagegen die Kurven ganz identisch.

Diese Abhängigkeit von der Zeit kann unter Umständen außerordentlich störend sein, insbesondere weil unter diesen Bedingungen, wenn man nicht mindestens 50 Minuten wartet, die Trübung weiter zunimmt, so daß vor allem in solchen Fällen die Testlösungen stets frisch bereitet werden müssen. Übrigens tritt bei zu langem Stehen gelegentlich auch Flockung auf, welche den Vergleich ganz unmöglich macht. Diesem Übelstand kann man ohne weiteres dadurch abhelfen, daß man zu der trüben Lösung in einem gewissen Zeitpunkt einige Kubikzentimeter einer Gummiarabikumlösung zufügt. Es hat sich als am zweckmäßigsten erwiesen, nach Fertigstellung der Mischung, also Auffüllen bis zur Marke und Stehenlassen für eine bestimmte Zeit, 2 ccm einer 10proz. Gummiarabikumlösung zuzufügen, welche man durch Verdünnung einer nach der Vorschrift des Arzneibuches hergestellten 30proz. Lösung erhalten hat. Es ist selbstverständlich Vorbedingung, daß diese Gummiarabikumlösung optisch leer ist. Dieser Zusatz hält die Trübung genau auf dem augenblicklichen Stande, er „bremst" also die Reaktion. Zufügen vor Ausbildung der Trübung, also sofort nach der Mischung, hindert das Entstehen der Trübung.

Diese Tatsache, daß eine mit Gummiarabikum versetzte Lösung ihre Trübung nicht mehr ändert, wurde dadurch bewiesen, daß frisch hergestellte Testlösungen, die z. B. 10 Minuten alt waren, in ihrer Trübung mit einer Lösung übereinstimmten, die nach der gleichen Zeit, also nach 10 Minuten, mit Gummiarabikum versetzt worden war und über 1 Stunde stehengelassen wurde. Die Kurve Abb. 3 zeigt diese

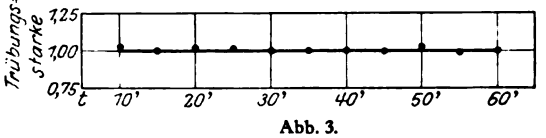


Abb. 3.

Verhältnisse. Die geringen Abweichungen um 2 Proz. nach oben oder unten rühren augenscheinlich daher, daß während der Ablesungszeit die Testlösung, die nicht gebremst ist, ein wenig altert. Zur Kontrolle wurde auch der umgekehrte Weg eingeschlagen. Als Test diente eine gebremste Phosphatlösung, mit der nun länger stehende Versuchs-

lösungen verglichen wurden. Das Bild, welches die Kurve Abb. 4 zeigt — das Alter der gebremsten Testlösung war 10 Minuten —, entspricht in seinem Charakter durchaus dem Bilde der Kurve II in Abb. 2 und zeigt ebenso wie diese die Zunahme der Trübung gegenüber einer Testlösung bestimmten Alters, das eben hier durch den Zusatz des Gummi-

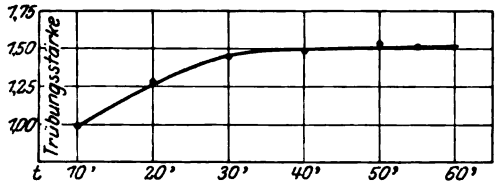


Abb. 4.

arabikums künstlich festgehalten wurde. Es sei noch hinzugefügt, daß die Beständigkeit der durch Zusatz von Gummiarabikumlösung gebremsten Molybdän-Strychnintrübung mindestens 2 bis 2½ Stunden beträgt, so daß es nunmehr möglich ist, dieselbe Testlösung für eine große Serie von Versuchen zu verwenden.

Die praktische Ausführung der Phosphatbestimmung gestaltet sich demnach folgendermaßen: Ein aliquoter Teil der aus der Veraschung gewonnenen, genau neutralisierten Lösung wird in ein 50-ccm-Kölbchen überführt, ebenso in ein anderes 5 ccm der Testlösung. Mit einer *Pipette* werden je 5 ccm der 1 + 2 verdünnten Salpetersäure zugefügt, bis ungefähr 45 ccm mit Wasser aufgefüllt, durchgemischt, schnell hintereinander in jedes Gefäß 2 ccm des Reagens zugegeben, zur Marke aufgefüllt, umgeschüttelt und eine mit der Uhr genau kontrollierte Zeit, am zweckmäßigsten 30 Minuten, stehengelassen. Jetzt werden zu jedem Kölbchen 2 ccm Gummiarabikumlösung zugegeben, durchmischt und nun nach beliebiger Zeit, aber nicht länger als nach 2½ Stunden, die nephelometrische Bestimmung ausgeführt. Sind in dieser Zeit noch andere Proben zu untersuchen, so werden sie in gleicher Weise behandelt und ebenfalls nach genau 30 Minuten mit Gummiarabikum versetzt. Die erste Testlösung kann, wenn sie nicht älter als 2½ Stunden ist, ohne weiteres zum Vergleich benutzt werden.

Nachschrift: Die nach Niederschrift dieser Arbeit erschienene Abhandlung von *Kleinmann* (diese Zeitschr. 174, 43, 1926) ist auf die hier niedergelegten Tatsachen ohne Einfluß. *P.*

Zur Methodik der Neutralfettbestimmung im Blute nach Ivar Bang.

Von

A. Löw.

(Aus der I. medizinischen Abteilung des Krankenhauses der Wiener Kaufmannschaft.)

(Eingegangen am 2. August 1926.)

Die Mikrobestimmung des Neutralfettes im Blute nach *Ivar Bang* wird als Differenzmethode zwischen der Chromsäurereduktion des Blutes einerseits und der Chromsäurereduktion des zu jeder Bestimmung gehörigen Leerversuchs andererseits ausgeführt. Nun hat sich uns der Übelstand ergeben, daß die Reduktionsgröße des Leerversuchs derjenigen des Blutfettes so nahe kommen kann, daß die Resultate zu unsicher sind, die Methode infolgedessen nicht verwertbar wurde. So erhielten wir bei Leerversuchen mit Vorlage von 1 ccm n/10 Chromsäure Reduktionen von 0,25 bis 0,35 ccm (0,3 ccm im Durchschnitt, bei Blutfettreduktionswerten von 0,36 ccm im Durchschnitt). Die Ursache dieses hohen Blindwertes kann nur darin liegen, daß der zur Fettextraktion verwendete Petroläther Chromsäure reduzierende Substanzen in größeren Mengen enthält, die bei der üblichen Destilllation — d. i. bei neutraler Reaktion — in das Destillat übergehen. Nun wird dieses Destillat im Verlauf der Fettbestimmung nach Zusatz von Alkali — zwecks Verseifung des Fettes — abgedampft, der Rückstand weiter verarbeitet. Da sich in diesem Rückstand die Chromsäure reduzierenden Substanzen befinden, so ergibt sich, daß nur jene reduzierenden Substanzen störend wirken, die bei Anwesenheit von Alkali nicht flüchtig, bei neutraler Reaktion jedoch flüchtig sind. Wenn nun der für die Fettbestimmung zu verwendende Petroläther nicht in der bisher üblichen Weise, d. i. bei neutraler Reaktion, sondern bei Gegenwart von Alkali gereinigt wird, so ist nun das Destillat von jenen Chromsäure reduzierenden Stoffen, die bei der Verseifung im Rückstand bleiben könnten, befreit. Tatsächlich erhielten wir, wenn der Petroläther bei Anwesenheit von Alkali (1 ccm n Lauge zu 500) destilliert

war, viel niedrigere Blindwerte als früher, nämlich bei Vorlage von 1 ccm n/10 Chromsäure, Reduktionen von 0,02 bis 0,08 ccm (0,05 ccm im Durchschnitt). Es ist klar, daß durch diese einfache Modifikation die Neutralfettbestimmung an Zuverlässigkeit gewinnt und im größeren Ausmaß als bisher für klinische Zwecke verwendet werden kann.

Zusammenfassung.

Es wird vorgeschlagen, bei der Neutralfettbestimmung nach *Ivar Bang* den zu verwendenden Petroläther zwecks Reinigung bei Anwesenheit von Alkali zu destillieren. Durch diese Modifikation werden genauere Resultate erzielt.

Untersuchungen über das Schicksal des Cadmiums nach parenteraler Einverleibung.

Von

Georg Hessel.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Halle-Wittenberg.)

(Eingegangen am 6. August 1926.)

Nachdem das Cadmium auf Grund der pharmakologischen Untersuchungen von *Kochmann* und der klinischen Anwendung durch *Grouven*[1]) in die Therapie der Syphilis eingeführt worden ist, war es wünschenswert, über sein Schicksal im Körper unterrichtet zu sein.

Untersuchungen dieser Art sind für Cadmium bisher nur von *Marmé*[2]) und *Schwartze* und *Alsberg*[3]) ausgeführt worden. *Marmé* konnte das resorbierte Cadmium im Blute, in der Leber, den Nieren, dem Herzen und Gehirn der Versuchstiere nachweisen. Die Ausscheidung beginnt nach ihm bald nach der Einverleibung und erfolgt mit Unterbrechungen hauptsächlich, wenn nicht ausschließlich durch die Nieren. Über die Art der Einverleibung des Cadmiums macht er keine bestimmten Angaben. Zum Nachweis fällte er das Cadmium nach Zerstörung der organischen Masse mit chlorsaurer Kali-Salzsäure als Cd S, das unter Umständen zur quantitativen gravimetrischen Bestimmung in Cd O übergeführt wurde. Für den Nachweis kleinerer Mengen benutzte er die elektrolytische Methode. Zahlenmäßige Angaben über die in den Organen und Ausscheidungen gefundenen Cadmiummengen macht er nicht.

Schwartze und *Alsberg* fütterten Katzen mit Cadmium und konnten dieses in der Leber, den Nieren, der Milz und im Urin nachweisen. Die resorbierten Cadmiummengen waren unbekannt. Zahlenmäßige Angaben liegen nur für die in den Organen gefundenen Cadmiummengen vor. Über die Methode des Nachweises ist nichts angegeben.

Ich stellte Versuche an Kaninchen, Hunden und Menschen an, über die Resorption des Cadmiums, seine Verteilung im Organismus

---

[1]) Deutsch. Med. Wochenschr. 1925, S. 427.
[2]) Zeitschr. f. rat. Med. 29, 125, 1867.
[3]) Journ. of Pharm. u. exper. Therap. 21, Nr. 1, 1923.

und seine Ausscheidung. Geprüft wurden zwei Präparate; das wasser- und ölunlösliche Cadmiumsubsalicylat in öliger Aufschwemmung[1]) bei intramuskulärer, und ein gut wasserlösliches Komplexsalz des Cadmiums bei intravenöser Applikation.

Der quantitative Nachweis des Cadmiums geschah durch folgenden Analysengang: Die nach Entblutung der Tiere gewonnenen Organe, ferner der gesammelte Urin und Kot wurden mit $KClO_3$ und HCl auf dem Wasserbad zerstört, die klare hellgelbe Flüssigkeit vom unzerstörbaren Rückstand abfiltriert, das Filtrat durch Eindampfen auf dem Wasserbad vom größten Teile der freien HCl befreit, mit Wasser aufgenommen und noch vorhandenes freies Chlor durch Kochen verjagt. Die Flüssigkeit wurde dann mit Wasser so weit verdünnt, daß der Säuregrad 1 ccm HCl konzentriert auf 100 ccm Flüssigkeit betrug, also etwa 0,38 Proz. Bei diesem Säuregrad ging die Fällung kleiner Cadmiummengen am besten vor sich. Unter Umständen war es nötig, eine geringe Menge NaOH zuzusetzen, um die Flüssigkeitsmenge zu beschränken. Das Cadmium wurde aus dieser Lösung mittels H_2S als CdS gefällt. Durch Fällung aus saurer Lösung vermeidet man, daß etwa anwesendes Fe und Zn mitgefällt wird, und erhält außerdem ein gut filtrierbares CdS. Das Einleiten von H_2S geschah in die heiße Flüssigkeit, wurde bis zum Erkalten fortgesetzt und währte etwa 1½ bis 2 Stunden. Während des Einleitens wurde die Lösung durch Zufließen von etwa 20 bis 50 ccm H_2O weiter verdünnt. Dadurch wird die Fällung des Cadmiums beschleunigt, bei kleinen Mengen oft sogar erst ausgelöst. Die mit H_2S gesättigte Flüssigkeit blieb 12 bis 24 Stunden, mit einem Korkstopfen lose verschlossen, stehen und wurde dann durch ein aschefreies Filter filtriert. Das Filtrat wurde sofort durch einen Rosenthal- (bzw. Berliner) Porzellanfiltriertiegel abgesaugt, der selbst Spuren von kolloidem CdS zurückhielt. Das Filter mit dem H_2S-Niederschlag wurde bei 100° getrocknet und im Porzellantiegel nach *Stolte*[2]) verkohlt und leicht geglüht. Es gelingt dadurch, den größten Teil der auch nach energischster Zerstörung mit $KClO_3$ und HCl noch in der Lösung verbleibenden organischen Substanzen, die durch H_2S mit ausgefüllt werden, zu beseitigen. Heftiges Glühen wurde vermieden, um keine Verluste durch Reduktion von CdS in leicht verdampfbares, metallisches Cd und durch Sublimation von Cd_2Cl_2S zu erleiden (Cd_2Cl_2S, Cadmiumsulfochlorid, wird gleichzeitig mit CdS in wechselnder Menge durch H_2S aus salzsaurer Lösung gefällt). Die Kohle wurde mit heißer HCl (1 : 3) aufgenommen, auf

[1]) Von der chemischen Fabrik v. Heyden in Radebeul-Dresden unter dem Namen „Cadmiol" in den Handel gebracht.

[2]) Diese Zeitschr. **85**, 104, 1911.

dem Wasserbad digeriert, gut verrieben, dann filtriert und mit heißem Wasser reichlich nachgewaschen. Außerdem wurde etwa an den Glaswänden haftendes CdS aus dem Gefäß, in dem die CdS-Fällung stattfand, mit heißer HCl herausgelöst und ebenfalls filtriert. Die beiden vereinigten Filtrate, die auf 100 ccm Flüssigkeit 1 ccm HCl konzentriert enthielten, wurden erhitzt und ebenfalls mit H_2S behandelt. Dabei fällt Cadmium wiederum als CdS aus. Die Flüssigkeit wurde nach etwa 12 Stunden durch den oben erwähnten Porzellanfiltriertiegel abgesaugt, das CdS darin durch HCl (1 : 3) gelöst, die HCl auf dem Wasserbad weggedampft, das zurückbleibende $CdCl_2$ in H_2O aufgenommen und die Menge auf kolorimetrischem Wege bestimmt. Dabei gab die Reagenzglasmethode, bei der eine Reihe Reagenzgläser mit der lichten Weite von 14 mm bekannte steigende Mengen Cd zum Vergleich enthielten, die besten Ergebnisse. Die Herstellung der Vergleichslösungen geschah folgendermaßen. Die Gläser wurden mit bekannten Mengen einer $CdCl_2$-Lösung beschickt, auf 9 ccm mit H_2O aufgefüllt, 1 ccm einer frisch bereiteten filtrierten 1proz. Gelatinelösung als Schutzkolloid zugesetzt, mit 10 Tropfen 25proz. Ammoniaklösung versetzt und zum Schluß 2 Tropfen einer frisch bereiteten Schwefelammonlösung zugesetzt. Das Schwefelammon erzeugt in dieser Lösung kolloides, grünlichgelb gefärbtes CdS von hinreichender Beständigkeit. Die zu prüfende Cadmiumlösung wurde genau so hergestellt. Das Vergleichen erfolgte im Komparator nach *Walpole* unter gleichzeitiger Vorschaltung einer Matt- und Blauglasscheibe. Es ließ sich auf diese Weise noch eine Konzentration von 1 : 70000 nachweisen, und da wir 10,5 ccm Flüssigkeit verwendeten, 0,15 mg Cd quantitativ fassen. Oberhalb von 0,15 mg Cd ließen sich die Unterschiede bis auf 0,1 mg Cd mit Sicherheit erkennen. Geringere Mengen ließen sich zahlenmäßig nicht mehr fassen, da das verwendete Schwefelammon selbst in frisch bereiteter Lösung eine gelblichgrüne Eigenfärbung hat, die bei 2 Tropfen Schwefelammon auf 10,5 ccm H_2O zwar unterhalb von der durch 0,15 mg Cd hervorgerufenen Färbung, aber dicht bei ihr liegt. Lag die Färbung einer Probe zwischen 0,15 mg Cd und der eben beschriebenen Eigenfärbung des Schwefelammons, so wurde dies als Spuren Cd bezeichnet. Es ist darauf zu achten, daß die organische Substanz energisch zerstört wird, da bei mangelhafter Zerstörung die Endreaktion eine störende Färbung nach braun hin zeigen kann. Eine gelbbraune Tönung geringen Grades jedoch, die gelegentlich bei Verarbeitung großer Mengen von Urin, besonders aber von Kot, auftreten kann, stört nicht, wenn man die kolorimetrische Messung im Komparator nach *Walpole* unter Vorschaltung einer Matt- und Blauglasscheibe vornimmt. Wir erhielten mit dieser Methode gut brauchbare Ergebnisse, wie die Probeanalysen zeigen, s. Tabelle I.

Tabelle I.

Nr.	Analysiert	$CdCl_2$		Fehler	
		zugesetzt mg	gefunden mg	mg	Proz.
1	1000 ccm Urin	10	10,2	+ 0,2	+ 2
2	1000 „ „	10	10,0	± 0	± 0
3	1000 „ „	5	5,3	+ 0,3	+ 6
4	1000 „ „	5	4,6	— 0,4	— 8
5	182 g Kot	5	4,5	— 0,5	— 10
6	1000 ccm Urin	3	2,7	— 0,3	— 10
7	1000 „ „	3	2,6	— 0,4	— 13,3
8	1000 „ „	2	1,4	— 0,6	— 30
9	65 g Fleisch	2	1,6	— 0,4	— 20

Aus der Tabelle sieht man, daß der prozentuale Fehler besonders bei den Analysen mit 3 und 2 mg $CdCl_2$ erheblich ist, aber in Anbetracht der kleinen absoluten Werte und der im Verhältnis zum gesuchten Cadmium ungeheuer großen Mengen organischer Substanz, die zerstört werden mußte, gering genannt werden kann. Aus Analyse 9 ist ersichtlich, daß er sich bei Verwendung geringer Mengen Substanz noch herabdrücken läßt. Es sei aber ausdrücklich erwähnt, daß auch die Elektrolyse für die quantitative Bestimmung solch kleiner Cadmiummengen unbrauchbar ist, obwohl wir unter allen Vorsichtsmaßregeln arbeiteten. Noch unbrauchbarer sind die gravimetrischen Bestimmungen, gleichgültig in welcher Form das Cadmium zur Wägung kommt.

Zunächst erschien es wichtig, über die Resorption des wasser- und ölunlöslichen Cadmiumsubsalicylats unterrichtet zu sein.

Zu diesem Zwecke wurden mehreren Kaninchen bekannte Mengen des Präparats in Form von Cadmiol intramuskulär eingespritzt; die Tiere wurden nach 1, 2 und 8 Wochen getötet und die ausgeschnittenen Injektionsstellen auf Cadmium geprüft. Die Ergebnisse der Versuche sind aus Tabelle II zu ersehen.

Tabelle II.

Versuchstier	Gewicht g	Datum der Injektion	Getötet am	Cd injiziert mg	Cd gefunden mg	Proz. des resorbierten Cd
Kaninchen 1	1370	26. IV.	4. V.	30	14,5	51,7
Kaninchen 2	1360	26. IV.	10. V.	30	15,4	48,7
Kaninchen 3	2185	9. I.	11. III.	20	3,7	81,5

Daraus ergibt sich, daß 1 und 2 Wochen nach der Injektion etwa 50 Proz. des injizierten Cadmiums noch in der Injektionsstelle zu finden ist, also noch nicht resorbiert war; und 8½ Wochen nach der Injektion fanden sich in der Injektionsstelle noch beinahe 20 Proz. des injizierten Cadmiums wieder, d. h. reichlich 80 Proz. waren bisher resorbiert. Die Resorption des unlöslichen Cadmiumsubsalicylats ist also stark verzögert, ähnlich den Befunden bei anderen schwer- oder unlöslichen Schwermetallverbindungen. Die Injektionsstellen zeigten nach einer Woche entzündliche Infiltrationen,

später Narbenbildung. Die Schwerlöslichkeit des Präparats zusammen mit den von ihm erzeugten pathologischen Prozessen erklären gut die langsame Resorption, besonders die starke Verzögerung nach der ersten Woche, nach der die narbige Ausheilung beginnt.

Über die Verteilung des Cadmiums in den Organen geben die Tabellen III und IV Auskunft.

Tabelle III.

Kaninchen 3 erhielt am 9. Januar 1926 0,4 ccm Cadmiol = 20 mg Cd in die Rückenmuskulatur injiziert. Am 11. März 1926 wurde es durch Entbluten getötet. Die Analyse der Organe ergab:

Organ	Gewicht g	Cd gefunden mg	Proz. vom Organgewicht	Proz. des injizierten Cd	Proz. des resorbierten Cd
Leber	70	4,0	0,0057	20	24,5
Zwei Nieren . . .	14	2,6	0,0186	13	16
1/2 Darm, Stücken aus Dünn- und Dickdarm . . .	—	0,3	—	1,5	1,8
Gehirn	—	Spuren	—	—	—
Herz	17	Spuren	—	—	—
Muskulatur . . .	56	0	—	—	—
Knochen	4 Rippen	0	—	—	—
Injektionsstelle .	30	3,7	—	18,5	—
		Zus. > 10,6 mg Cd = > 53 Proz. des injizierten Cd			

Tabelle IV.

Kaninchen 2 erhält am 28. April 1926 30 mg Cd in Form von Cadmiol in die Rückenmuskulatur injiziert. Am 10. Mai 1926 wird es durch Entbluten getötet. Die Analyse der Organe ergab:

Organ	Gewicht g	Cd gefunden mg	Proz. vom Organgewicht	Proz. des injizierten Cd	Proz. des resorbierten Cd
Leber	53	3,7	0,0069	12,3	25,3
Zwei Nieren . .	13	1,72	0,0132	5,7	11,8
Milz	1,9	0,2	0,0105	0,7	1,4
Darm, 1/2 Dünn-, 1/2 Dickdarm .	—	Spuren	—	—	—
Lunge	—	0	—	—	—
Injektionsstelle .	—	15,4	—	51,3	—
		Zus. > 21,0 mg Cd = > 70 Proz. des injizierten Cd			

Es war also von 20 mg Cadmium, die in Form des unlöslichen Präparats Cadmiol intramuskulär eingespritzt wurden, nach 61 Tagen über die Hälfte im Körper wiederzufinden. Davon befindet sich ein ansehnlicher Teil (35 Proz.) in der Injektionsstelle, das übrige in den Organen, und zwar hauptsächlich in Leber und Nieren. Auffallend groß ist die in den Nieren lokalisierte Menge. Sie ist zwar absolut kleiner als die in der Leber gespeicherte Menge, relativ aber weitaus größer, reichlich dreimal so groß.

Am Tage der Tötung war die Hälfte des injizierten Cadmiums, etwa 15 mg, resorbiert; davon fanden sich in den Organen $> 5{,}6$ mg $= > 38$ Proz. wieder. Die Verteilung auf die Organe entspricht im wesentlichen derjenigen in Tabelle III, die *absolut* größte Menge ist in der Leber gespeichert, die *relativ* größte in den Nieren.

Auch bei anderen Versuchstieren war dieses Verhältnis ähnlich, wie folgende Tabelle zeigt.

Tabelle V.

Organ	Gewicht g	Cd gefunden mg	Proz. vom Organgewicht	
		Hund.		
Leber	280	2,6	0,0009	$\frac{\text{Leber}}{\text{Nieren}} = \frac{1}{3{,}2}$
Zwei Nieren	52	1,5	0,0029	
		Kaninchen 4.		
Leber	129	1,1	0,0009	$\frac{\text{Leber}}{\text{Nieren}} = \frac{1}{6{,}3}$
Zwei Nieren	21	1,2	0,0057	

Die übrigen Organe beider Tiere enthielten teils Spuren, teils überhaupt kein Cadmium.

Die Galle wurde mehrfach untersucht, ohne daß Cd in ihr gefunden werden konnte. Betrachtet man die später zu erwähnenden Ausscheidungsverhältnisse des Cd, aus denen ersichtlich ist, daß die Ausscheidung in Spuren erfolgt, dann ist verständlich, daß in den geringen Gallemengen, welche die Gallenblase der Versuchstiere enthielten, keine analysierbaren Mengen von Cd zu finden waren. Weiter wurden auch die Keimdrüsen untersucht, deren Empfindlichkeit gegenüber toxischen Eingriffen [siehe *Stieve*[1])] ja bekannt ist. Diese wurden bei Tieren, die mit Cd vergiftet worden waren, auffallend hyperämisch gefunden, so daß die Vermutung nahe lag, auch in ihnen könnte Cd gespeichert sein; um so mehr, als für das dem Cd chemisch nahestehende Zn eine Speicherung in den Hoden bei manchen Tieren in der Tat nachgewiesen worden ist. Cd war in den untersuchten Keimdrüsen nicht zu finden. Es kann natürlich in Mengen vorhanden sein, die sich dem chemischen Nachweis entziehen, aber genügen, so empfindliche Organe wie die Keimdrüsen zu schädigen.

Unsere Ergebnisse stimmen mit denen, die *Schwartze* und *Alsberg* (a. a. O.) bei peroraler Darreichung von Cadmium an Katzen erhielten, gut überein. Sie fanden Cadmium in Leber, Nieren und zuweilen in der Milz gespeichert; die Hauptmenge in Leber und Nieren. In Herz, Lunge, Gehirn, Magen, Darm, Knochen, Muskulatur, Blut und Galle konnten sie kein Cadmium finden.

Um festzustellen, welche Verteilung das Cadmium im Organismus bei sofortiger, vollständiger Resorption erfährt, injizierten wir einem Hunde 20 mg Cd in Form eines gut wasserlöslichen Komplexsalzes intravenös. Das Tier wurde 4 Wochen später getötet und die Analyse der ausgebluteten Organe hatte folgende Ergebnisse (s. Tabelle VI).

Auch hier fand sich 4 Wochen nach der Injektion noch ein erheblicher Teil des injizierten Cadmiums im Organismus wieder, und zwar zum größten Teile in der Leber. Die Nieren enthielten in diesem Falle relativ und absolut wenig Cadmium.

---

[1]) Arch. f. mikrosk. Anat. u. Entwicklungsmech. **99**, 390, 1923.

Tabelle VI.

Organ	Gewicht g	Cd gefunden mg	Proz. vom Organgewicht	Proz. des injizierten Cd
Leber	445	6,8	0,0015	34
Zwei Nieren	80	0,6	0,0008	3
Milz	65	0,2	0,0003	1
Darm zur Hälfte . .	135	0	—	—
Herz	145	Spuren	—	—
Gehirn	—	Spuren	—	—
Muskulatur	150	0	—	—
Knochen	Os femoris	0	—	—
		Zus. $>$ 7,6 mg Cd $=$ $>$ 38 Proz des injiz. Cd		

Diese Versuche zeigen, daß das Cadmium lange Zeit im Körper gespeichert wird, gleichgültig, ob allmähliche oder sofortige Resorption, wie bei intravenöser Einverleibung, eintritt. Die Speicherung erfolgt überwiegend in Leber und Nieren. Nach diesen Befunden war vorauszusehen, daß die Ausscheidung nur langsam und in geringen Mengen erfolgen kann; denn die Berechnung ergibt, daß in einem Falle etwa 9 mg Cd im Laufe von 61 Tagen ausgeschieden wurden (s. Tabelle III); in einem anderen Falle brauchte dieselbe Menge Cd 2 Wochen (s. Tabelle IV), und in einem weiteren Falle bedurften etwa 12 mg Cd 4 Wochen zur Ausscheidung (s. Tabelle VI).

Die Ausscheidung wurde an Kaninchen, Hunden und Menschen verfolgt, denen ebenfalls Cadmiol intramuskulär oder das wasserlösliche Cadmiumkomplexsalz intravenös injiziert wurde. Aus den Versuchsreihen seien folgende angeführt.

Tabelle VII.

Kot und Urin von Kaninchen 3, dem am 9. Januar 1926 20 mg Cd intramuskulär injiziert wurden, wurde in Portionen von mehreren Tagen analysiert und ergab:

Urin		Kot	
1. bis 3. Tag	Spuren Cd	1. bis 3. Tag	Kein Cd
4. „ 9. „	„ „	4. „ 6. „	Spuren „
10. „ 14. „	„ „	7. „ 9. „	Kein „
15. „ 50. „	Nicht analysiert	10. „ 12. „	Spuren „
51. „ 61. „	0,31 mg Cd	13. „ 50. „	Nicht analysiert
		51. „ 61. „	0,5 mg Cd

Die Ausscheidung erfolgt also kontinuierlich in geringen Mengen, wobei ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den im Urin und den im Kot gefundenen Mengen nicht besteht. Es hat den Anschein, als ob die Ausscheidung durch den Kot erst später beginnt als durch den Urin. Man darf wohl annehmen, daß die gefundenen Spuren Cd in ihrer Gesamtheit einige Milligramme ausmachen, die sich mit den nach Tötung des Tieres im Organismus vorgefundenen 11 mg Cd beinahe zu der injizierten Menge von 20 mg addieren lassen, wenn man berücksichtigt, daß eine Differenz

von wenigen Milligrammen in dem komplizierten Analysengang bei den zahlreichen Analysen verloren gegangen sein kann.

Versuche an Menschen, die zu therapeutischen Zwecken Cadmiol eingespritzt erhielten, hatten ganz ähnliche Ergebnisse. Selbst nach großen Dosen Cadmiol und lange fortgesetzter Einverleibung ließen sich nur verhältnismäßig geringe Mengen Cadmium in den Ausscheidungen nachweisen. Auch hier hat es den Anschein, daß die Ausscheidung durch den Urin eher beginnt als durch den Kot. Wie gering die Mengen sind, die selbst nach lange fortgesetzter Injektion von Cadmiol ausgeschieden werden, zeigt folgende Tabelle.

Tabelle VIII.

Patientin *K.*, weiblich, erhält seit 26. Januar 1926 zweimal in der Woche 1 ccm Cadmiol (= 50 mg Cd) intramuskulär. Urin und Kot wird vom 20. Februar 1926 ab gesammelt und in Portionen von je 3 Tagen verarbeitet. Folgende Mengen Cadmium wurden gefunden:

Datum	Cd bisher injiziert mg	Cd im Urin mg	Cd im Kot mg
20. bis 22. II.	400	0,5	1,5
23. „ 25. II.	450	0,3	0,6
26. „ 28. II.	500	0,6	1,0
1. „ 3. III.	550	0,7	1,9
4. „ 6. III.	600	Spuren	1,0
7. „ 9. III.	650	0,4	0,7
10. „ 12. III.	700	0,2	Kein Cd
13. „ 15. III.	700	Spuren	0,25
16. „ 18. III.	750	0,8	0,9
19. „ 21. III.	750	0,3	0,75
22. „ 24. III.	800	0,15	1,6
25. „ 27. III.	850	0,4	1,35
28. „ 30. III.	900	0,38	Spuren
31. III. bis 23. IV.	950—1200	Nicht analysiert	
24. bis 26. IV.	1250	0,25	0,85

Es wurden also im Laufe von 39 Tagen (20. Februar bis 30. März) im Urin rund 5 mg Cd, im Kot 11,5 mg Cd, insgesamt 16,5 mg Cd ausgeschieden, d. h. nur etwa 3 Proz. der injizierten Menge, wenn man für die nicht untersuchten Proben vom 26. Januar bis 19. Februar gleiche Werte annimmt. Dabei ist allerdings zu beachten, daß von den injizierten 900 mg Cd am 30. März wohl ein erheblicher Teil noch in den Injektionsstellen liegen dürfte, wie die Versuche am Tiere über die Resorption des Cadmiols (siehe Tabelle I) wahrscheinlich machen.

Die Ausscheidung erfolgt auch bei intravenöser Einverleibung eines gut löslichen Präparats nur sehr langsam. Darüber gibt Tabelle IX Auskunft.

Die Ausscheidung des Cadmiums erfolgte sowohl durch den Urin als durch den Kot, jedoch ist hierbei die durch den Urin abgeschiedene Menge größer als die im Kot gefundene. Wie schon oben erwähnt, waren in den Organen dieses Hundes am 23. April 1926 noch etwa 8 mg Cd zu finden, so daß im Verlauf des vierwöchigen Versuchs etwa 10 bis 12 mg Cd ausgeschieden sein dürften. Gefunden wurden, wenn die Spuren mit etwa

Tabelle IX.

Ein Hund (derselbe von Tabelle VI), 20 kg, erhielt am 26. März 1926 20 mg Cd in Form eines wasserlöslichen Komplexsalzes intravenös. Urin und Kot wurden gesammelt. Die Analysen ergaben:

Datum	Urin	Cd	
	ccm	im Urin	im Kot
26.—28. III.	1725	Spuren	Spuren
29.—31. III.	1380	0,24 mg	
1.— 3. IV.	1920	Spuren	Spuren
4.— 6. IV.	1900	„	
7.— 8. IV.	1150	0,15 mg	kein Cd
9.—10. IV.	1780	0,19 „	
11.—12. IV.	1600	Spuren	Spuren
13.—14. IV.	1640	0,2 mg	
15.—16. IV.	675	0,22 „	kein Cd
17.—19. IV.	1975	0,3 „	0,15 mg
20.—21. IV.	370	Spuren	Spuren
22.—23. IV.	790	„	

0,1 mg Cd angenommen werden, nur rund 2,5 mg Cd. Es ist wohl anzunehmen, daß die fehlenden 7,5 bis 9,5 mg Cd ebenfalls ausgeschieden worden sind, aber in den zahlreichen Analysen verloren gegangen sind. Das erscheint als ein großer Verlust; es ist aber zu bedenken, daß insgesamt 27 Analysen nötig waren, mit etwa 17 Liter Urin, 2 kg Kot und 1200 g Organen, um den Verbleib der 20 mg Cd, die eingespritzt wurden, aufzuklären. Bei Annahme eines durchschnittlichen Fehlers von — 0,3 bis — 0,4 mg Cd pro Analyse kommt man in der Tat etwa auf die fehlenden 7,5 bis 9,5 mg Cd. Selbst wenn man danach annehmen muß, daß die bei den Ausscheidungsanalysen gefundenen Werte um einige Zehntel Milligramme hinter den wirklich ausgeschiedenen Cadmiummengen zurückbleiben, so sind diese Mengen doch so gering, daß sie an dem Gesamtbild nichts ändern, welches zeigt, daß das Cadmium sehr langsam und kontinuierlich in kleinsten Mengen durch Kot und Urin ausgeschieden wird, ähnlich wie das Quecksilber.

Eine größere Ausscheidung von Cd in den ersten Stunden nach der intravenösen Verabreichung, wie sie für manche Schwermetalle nachgewiesen worden ist, ließ sich für Cadmium nicht finden. Bei einem Kaninchen, dem 6 mg Cd intravenös gegeben wurden, und das 4 Stunden nach der Injektion getötet wurde, war im Urin und Kot dieser 4 Stunden kein Cd zu finden. Bei einem weiteren Tiere, das 15 mg Cd intravenös erhielt, fanden sich im Urin der ersten 24 Stunden nach der Injektion 0,64 mg und im Kot derselben Zeit nur Spuren von Cd.

Im Blute ließ sich Cadmium schon 4 Stunden nach intravenöser Verabreichung nicht einmal qualitativ mit Sicherheit nachweisen. Einem Kaninchen wurden zu diesem Zwecke 6 mg Cd als Komplexsalz intravenös injiziert. Nach 4 Stunden wurde das Tier entblutet und sein Gefäßsystem mit körperwarmer Ringerlösung gespült, so daß wir praktisch die gesamte Blutmenge zur Analyse erhielten. Darin war kein Cadmium zu finden; das gesamte Cadmium war bereits in den Organen abgelagert.

Zusammenfassung.

1. Das Cadmium verhält sich im tierischen Organismus ähnlich wie das Quecksilber, dem es ja chemisch nahesteht und mit dem es auch in der Wirkung große Ähnlichkeit aufweist.

2. Die Resorption des unlöslichen Cadmiumsubsalicylats (des in der Therapie gebrauchten Cadmiols) geht sehr langsam vor sich und beansprucht viele Wochen.

3. Sowohl bei allmählicher als bei sofortiger Resorption (intravenöse Injektion) wird das Cadmium im Körper gespeichert, und zwar vorwiegend in Leber und Nieren. Dabei ist bemerkenswert, daß die Leber die *absolut* größte Menge, die Niere die *relativ* (prozentisch) größte Menge enthält; die übrigen Organe enthalten Spuren Cadmium oder sind frei davon. Aus dem Blute verschwindet das Cadmium nach intravenöser Injektion schon in kürzester Zeit.

4. Die Ausscheidung erfolgt kontinuierlich sowohl durch die Nieren als den Darm ohne Bevorzugung einer der beiden Stellen. Während das Cadmium im Urin bereits in den ersten Tagen nach der Injektion erschien, konnte es im Kot meist erst vom vierten und fünften Tage an nachgewiesen werden. Selbst nach lange fortgesetzter Injektion relativ großer Cadmiummengen sind die ausgeschiedenen Mengen äußerst gering. Auch nach intravenöser Injektion, also bei sofortiger vollständiger Resorption, geht die Ausscheidung langsam vor sich. So brauchten 10 bis 12 mg Cd, die intravenös gegeben wurden, etwa 4 Wochen zu ihrer Ausscheidung.

Über die Folgerungen, die sich aus diesen Versuchen für die Therapie ergeben, wird an anderer Stelle berichtet werden.

Über den relativen Nährwert der synthetischen Fette.

Von

Junichi Ozaki.

(Mitgeteilt von Prof. *U. Suzuki* aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 9. August 1926.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

I. Über den relativen Nährwert der synthetischen Fette, die sich von Fettsäuren mit ungeraden Kohlenstoffatomen ableiten.

Es ist wohl bekannt, daß die in der Natur vorkommenden Fette fast ausschließlich aus Fettsäuren von geraden Kohlenstoffatomen bestehen. *K. Takahashi*[1]) hat in unserem Laboratorium neulich eine Reihe von Triglyceriden aus reinen Fettsäuren dargestellt und Fütterungsversuche mit weißen Ratten ausgeführt. Er beobachtete, daß die Fette der niederen Fettsäuren von 6 bis 12 C-Atomen besser ausgenutzt werden als die der höheren Fettsäuren, wie Palmitin-, Stearin- oder Oleinsäure. Auch das Gemisch von Fettsäuren und Glycerin zeigte niedrigeren Nährwert als die betreffenden Triglyceride. Dieser Unterschied war viel deutlicher, wenn die Ratten mit vitamin-A-armem Futtergemisch gefüttert wurden. Besonders die festen Fette, wie Stearin und Palmitin, wurden schwerer ausgenutzt; das Wachstum des Tieres wurde oft dadurch geradezu verhindert, falls sie nicht mit reichlichem Vitamin A gefüttert wurden, während die niederen Glieder, wie Caprylin, Caprin, Laurin und Myristin, leichter assimiliert wurden und das Wachstum förderten, selbst wenn sie mit weniger Vitamin A versetzt waren.

Man kann die ungleich gute Qualität des Butterfettes leicht dadurch erklären, daß es meistens aus niederen Fetten, wie Butyrin, Caprylin und Laurin, besteht, während die höheren Fette, wie Palmitin und Stearin, nur in geringer Menge darin vorhanden sind. *Takahashi* beobachtete ferner, daß die Ratten mit fettfreiem Futtergemisch fast normales Wachstum erreichten, wenn die übrigen Nährstoffe reichlich

[1]) *K. Takahashi*, Journ. Chem. Soc. Japan **43**, 1922.

und in gutem Verhältnis gegeben wurden. So kann man die Fette, wenigstens für gewisse Tierarten, nicht mehr als unentbehrlichen Nährstoff betrachten.

Der Verfasser hat nun eine Reihe von Tierversuchen mit synthetischem Fett von ungeraden C-Atomen ausgeführt, um den Nährwert derselben mit dem natürlichen Fette zu vergleichen.

Vom klinischen Standpunkt kann dieser Versuch für den Diabetiker auch von gewisser Bedeutung sein. Es ist nämlich von einigen Autoren behauptet worden, daß synthetisches Margarin („Intervin"), welches aus Margarinsäure von 17 C-Atomen besteht, für Diabetiker unschädlich sei, weil es nach *Knoop*scher β-Oxydationstheorie keine giftige Acetonkörper als Stoffwechselprodukt bildet. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß andere Giftstoffe, wie z. B. Propionsäure, Isovaleriansäure usw. durch Oxydation des Intervins gebildet werden, welche ebenso schädliche Wirkung wie Acetonkörper entfalten können. Um diese Frage zu entscheiden, muß man unbedingt sorgfältige Tierversuche mit reinen synthetischen Fetten ausführen.

Experimenteller Teil.

1. Darstellung der Fettsäuren mit ungeraden C-Atomen.

Die niederen Fettsäuren, wie Propionsäure und Isovaleriansäure, wurden durch sorgfältige Fraktionierung der käuflichen Präparate gereinigt.

Zur Darstellung der Heptylsäure $C_7H_{14}O_2$ wurde das Ricinusöl der trockenen Destillation unterworfen. Die Reaktion verläuft nach folgendem Schema:

$$\underset{\text{Ricinoleinsäure}}{C_6H_{13}CH(OH)CH_2CH:CH(CH_2)_7COOH} \rightarrow \underset{\text{Oenanthol}}{C_6H_{13}CHO} + \underset{\text{Undecylensäure}}{CH_2:CH.CH_2(CH_2)_7COOH}$$

Das Destillat enthielt Oenanthol und Undecylensäure und der Rückstand bestand aus harzartiger Masse, die meistens durch Polymerisation der Undecylensäure entsteht.

Man fraktionierte nun dieses Destillat und die bei 73 bis 85° (80 mm) abdestillierende Oenantholfraktion wurde durch Chromsäuremischung oxydiert. Das Oxydationsprodukt wurde wieder bei 20 mm Druck fraktioniert. Die bei 121 bis 122° überdestillierte Flüssigkeit bestand fast ausschließlich aus reiner Heptylsäure. Die Molekulargewichtsbestimmung nach der Titriermethode gab folgende Zahlen:

$C_7H_{14}O_2$, Mol.-Gew. Gef.: 130,65, Ber.: 130,33.

Pelargonsäure $C_9H_{18}O_2$ wurde durch Oxydation der Dioxystearinsäure mit Chromsäure und Schwefelsäure in gewöhnlicher Weise dargestellt. Unter 20 mm Druck destillierte sie bei 150° über.

$C_9H_{18}O_2$, Mol.-Gew. Gef.: 158,62, Ber.: 158,20.

Undecylensäure $C_{11}H_{20}O_2 = CH_2:CH(CH_2)_8COOH$.

Das durch Trockendestillation des Ricinusöls erhaltene Destillat wurde fraktioniert und die bei 165° (15 mm) ablaufende Fraktion erwies sich als reine Undecylensäure.

$C_{11}H_{20}O_2$, Mol.-Gew. Gef.: 191,20, Ber.: 184,17.

Undecylsäure $C_{11}H_{22}O_2$ wurde in bekannter Weise durch katalytische Reduktion der Undecylensäure in Gegenwart von Platinschwarz dargestellt:

$C_{11}H_{22}O_2$, Mol.-Gew. Gef.: 186,30, Ber.: 186,17.

Tridecylen-, Pentadecylen- und Margarinsäure wurden nach dem Verfahren von *Levene* und *West*[1]) dargestellt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf folgender Reaktion:

$$R—CH_2COOH \xrightarrow{\text{Bromieren}} R.CH.Br.CO.Br \xrightarrow{KOH} R.CHOH.COOH \xrightarrow{\text{Oxydation}} R.COOH$$

So erhält man aus Myristinsäure Tridecylensäure und aus Palmitinsäure Pentadecylensäure usw.

Myristinsäure wurde aus Muskatbutter in üblicher Weise dargestellt und aus Alkohol umkristallisiert.

Mol.-Gew. Gef.: 228,14, Ber.: 228,22.

Zur Darstellung der Tridecylensäure wurden 100 g Myristinsäure mit 5 g rotem Phosphor (welcher vorher sorgfältig gewaschen, von Phosphorsäure befreit und getrocknet war) gemischt und mit 45 ccm Brom tropfenweise versetzt. (Das Brom muß absolut wasserfrei sein. Zu diesem Zwecke wurde es in einem Scheidetrichter mit ½ Vol. konzentrierter H_2SO_4 gemischt und über Nacht stehengelassen. Das völlig getrocknete Brom wurde dann von H_2SO_4 getrennt.) Nachdem das ganze Brom zugesetzt war, erhitzte man die Flüssigkeit allmählich, bis kein Bromdampf mehr zu beobachten war.

$$3(R.CH_2COOH + P + 11.Br = 3(R.CH.BrCO.Br) + PO_3H + 5HBr.$$

Die durch Eingießen der dunkelbraunen Flüssigkeit in Wasser ausgeschiedene Masse, die allmählich eine butterähnliche Konsistenz annimmt, wurde mit heißem Wasser gewaschen, in überschüssiger Natronlauge gelöst und 20 bis 24 Stunden erhitzt; nach dem Erkalten der Flüssigkeit schied sich das Natriumsalz der α-Oxysäure als harte Masse aus. Dasselbe wurde mit Wasser und Alkohol gewaschen und mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt. Die in der Weise erhaltene freie α-Oxysäure wurde jetzt aus 70proz. Alkohol umkristallisiert, in Petroläther gelöst, und beim Verdampfen des Lösungsmittels wurde die α-Oxysäure als reine weiße Kristalle erhalten.

20 g der so erhaltenen reinen α-Oxysäure wurden jetzt in 500 ccm Aceton gelöst und mit einer warmen acetonischen Permanganatlösung behandelt, bis sich die Flüssigkeit schwach rötlich färbte. Man erhitzte nun einige Zeit auf dem Wasserbade und ließ erkalten. Es schied sich dadurch das Kaliumsalz der Tridecylensäure zusammen mit braunem Manganhydroxyd aus. Extrahierte man diesen Niederschlag dreimal mit heißem 90proz. Alkohol, so ging das Kaliumsalz in Lösung.

Das Kaliumsalz wurde jetzt in das Bariumsalz verwandelt und wieder mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt. Die Analyse der so erhaltenen

---

[1]) *Levene* und *West*, Journ. f. Biochem. **16**, 1924.

freien Tridecylensäure gab folgendes Resultat: Schmelzpunkt 40,0° (Literaturangabe 40,0, 40,5, 42,5).

Mol.-Gew. Gef.: 214,77, Ber.: 214,20.

Pentadecylensäure, $C_{15}H_{30}O_2$, erhielt man aus käuflicher Palmitinsäure genau in oben erwähnter Weise. Schmelzpunkt 51,5° (Literaturangabe 51,0, 53,0°).

Mol.-Gew. Gef.: 243,80, Ber.: 242,24.

Margarinsäure, $C_{17}H_{34}O_2$, wurde ebenfalls aus käuflicher Stearinsäure dargestellt. Schmelzpunkt 55 bis 56° (Literaturangabe 59,9, 60 bis 61°).

Mol.-Gew. Gef.: 270,88, Ber.: 270,27.

2. Darstellung der Triglyceride aus Fettsäuren und Glycerin.

Die Synthese der Triglyceride wurde mittels *Twitchell*schem Reagenz leicht ausgeführt. Um dieses Reagens zu bereiten, löste man 10 g Naphthalin und 20 g Ölsäure in 30 ccm Petroläther und setzte 22,3 ccm konzentrierter H_2SO_4 innerhalb 1 bis ½ Stunde zu. Während der Reaktion muß die Temperatur unter 30° gehalten werden. Man ließ das Reaktionsgemisch über Nacht stehen, verdünnte mit fünf- bis sechsfachen Mengen Wasser und erwärmte noch 2 Stunden auf dem Wasserbad. Das Reaktionsprodukt wurde dann von wässeriger Schicht getrennt und mit Petroläther gewaschen. Das in der Weise erhaltene *Twitchell*sche Reagens besteht aus Naphthalinsulfostearinsäure.

Zur Darstellung der Triglyceride wurde die berechnete Menge Glycerin mit kleinem Überschuß von Fettsäuren gemischt; man gab dazu 5 Proz. *Twitchell*sches Reagens und erhitzte etwa 5 Stunden auf 100°; während der Reaktion wurde die Flüssigkeit stets umgerührt, um das gebildete Wasser zu verjagen. Nach dem Ende der Reaktion wurde das Gemisch in Äther gelöst und vorsichtig mit verdünntem Alkali, Säuren und Wasser sukzessiv gewaschen. Die ätherische Lösung wurde nach dem Trocknen mit Natriumsulfat abgedampft und je nach der Natur des Fettes dasselbe im Vakuum destilliert oder aus Alkohol und Äther umkristallisiert.

In dieser Weise hat der Verfasser 14 Sorten Fette dargestellt. Sie waren vollkommen neutral und hatten folgende Verseifungszahlen.

	Mol.-Gew.	Verseifungszahl			Mol.-Gew.	Verseifungszahl	
		Gef.	Ber.			Gef.	Ber.
Triacetin . .	216	772,0	772,0	Undecylenin	590	286,1	285,1
Tripropionin	260	609,0	647,0	Undecylin .	596	283,9	284,1
Butyrin . .	302	540,0	556,2	Tridecylin .	680	252,3	250,9
Isovalerin .	344	476,4	489,2	Pentadecylin	764	212,0	214,2
Heptylin . .	428	394,1	392,5	Palmitin . .	806	207,1	208,8
Caprylin . .	470	357,4	348,0	Margarin . .	846	197,1	198,2
Nonylin . .	512	329,3	328,3	Stearin . .	890	191,4	189,1

Wie man sieht, weicht die Verseifungszahl des Propionins, Butyrins und Isovalerins etwas von der berechneten ab. So wurde die weitere Reinigung durch Fraktionierung versucht, was aber wegen Zersetzung

unter Acroleinbildung nicht gelang. Das Triacetin wurde mittels Alkohol und Äther gereinigt und stimmte besser mit der Theorie. Um das eventuell anhaftende Acrolein zu beseitigen, löste man die Fette in Äther, schüttelte mit $KMnO_4$ und dann mit Wasser, bis die Flüssigkeit keine Reaktion mehr mit Piperidin und Natriumnitroprussid gab.

Außer den oben angegebenen synthetischen Fetten wurden noch Butter- und Schweinefette für Kontrollversuche angewendet.

Fütterungsversuche.

Junge, weiße Ratten von 40 bis 100 g wurden vorher mit einer beschränkten Menge Grundfutter gefüttert (9 g Trockensubstanz pro Tag). Jede einzelne Ratte wurde getrennt im Metallkäfig gehalten. Die Tiere wachsen anfangs in normaler Weise. Es kommt aber bald zum Stillstand, wenn das gegebene Futter nicht mehr für weiteres Wachstum ausreichte. In diesem Zeitpunkt wurde das Grundfutter mit je 5, 10, 15 und 20 Proz. der zu untersuchenden Fette zugesetzt und den Tieren gegeben. Werden die zugesetzten Fette von Tieren ausgenutzt, so fangen sie an, wieder zu wachsen. Wenn sie dagegen giftig oder wertlos sind, so nimmt das Körpergewicht ab oder es bleibt konstant.

Die Darstellung des Körpergewichts in Kurven gestattet den Vergleich der relativen Nährwerte der untersuchten Fette.

Zubereitung des Grundfutters.

Stärke: Möglichst reine Stärke wurde mit 85- bis 90proz. Alkohol dreimal je 5 Stunden extrahiert und getrocknet.

Pferdefleisch wurde je dreimal mit Alkohol und Äther extrahiert und fein gepulvert.

Mc Collum-Salz wurde nach der Vorschrift von *Mc Collum* gemischt.

Vitamin A: 0,5proz. alkoholische Lösung von „Biosterin". 1 Tropfen derselben entspricht 0,25 mg Biosterin.

Vitamin B: Käufliche Oryzaninlösung.

Zur Bereitung des Grundfutters wurden 72,0 g Stärke, 13,5 g Fleischpulver, 4,5 g Mc Collum-Salz, 4 ccm Oryzanin und 10 Tropfen Biosterinlösung mit 150 ccm Wasser durchgemischt und auf dem Wasserbad vorsichtig eingedampft, bis die ganze Masse zu einem harten Brei gestand.

Zur Bereitung des Versuchsfutters wurden je 5, 10, 15 und 20 Proz. der zu untersuchenden Fette zum Grundfutter zugesetzt, und zwar in folgenden Mengenverhältnissen:

	1. Proz.	2. Proz.	3. Proz.	4. Proz.
Fette	5,0	10,0	15,0	20,0
Stärke	76,2	71,3	68,0	64,0
Fleischpulver	14,3	13,3	12,8	12,0
Mc Collum-Salz . . .	4,5	4,4	4,2	4,0
Oryzanin	4,0	4,0	4,0	4,0
Biosterin	10 Tropfen	10 Tropfen	10 Tropfen	10 Tropfen

Außerdem wurden Parallelversuche mit Stärke, Rohrzucker und Glycerin in denselben Mengenverhältnissen durchgeführt. Das Maximalgewicht, das die Tiere mit 9 g Grundfutter erreichen konnten, war je nach der Individualität, äußeren Temperatur und anderen Bedingungen verschieden. Besonders hatte die Lufttemperatur den größten Einfluß auf das Wachstum. Die nachstehende Tabelle zeigt die Schwankung des Maximalgewichts in verschiedenen Monaten des Jahres:

Monate	Max. Körpergewicht g	Lufttemperatur °C	Monate	Max. Körpergewicht g	Lufttemperatur °C
Januar . .	53,8	2,7	Juli	102,1	26,0
Februar . .	57,6	4,4	August . .	122,1	26,1
März . . .	56,5	5,0	September .	98,3	21,8
April . . .	62,0	14,7	Oktober . .	79,3	13,3
Mai	65,4	16,9	November .	36,0	9,8
Juni. . . .	67,7	19,3	Dezember .	50,7	5,2

Hieraus geht hervor, daß ein großer Unterschied im Maximalgewicht des Sommers und Winters besteht. Von Anfang Dezember bis Ende März wurden die Ratten in große, elektrisch heizbare Glaskasten gebracht und die Temperatur annähernd bei 10° gehalten. Das Wachstum war deshalb gleichmäßiger. Das Maximum lag zwischen 50 bis 60 g. Ohne Heizung konnten die Ratten die Kälte nicht aushalten. Allerdings muß man die Fütterungsversuche immer in derselben Jahreszeit unter möglichst gleichen Bedingungen ausführen, um zuverlässige Resultate zu bekommen.

Ergebnisse der Fütterungsversuche.

Die durchschnittliche Gewichtszunahme nach dem Zusatz von 5 Proz. verschiedener Fette zum Grundfutter war wie folgt:

Palmitin . . . 48,0 g	Caprylin . . . 43,0 g	Acetin . . . . 37,0 g
Butyrin . . . . 32,5 g	Undecylin . . 20,0 g	Nonylin. . . . 20,0 g
Tridecylin . . . 17,5 g	Margarin . . . 4,0 g	Stearin . . . . 3,5 g
Heptylin . . . 37,0 g	Pentadecylin . 20,0 g	

Bemerkenswert ist, daß das Acetin nahrhaft ist. Beim Zusatz von 5 Proz. desselben nahmen die Tiere ziemlich an Gewicht zu. Propionin, Isovalerin und Undecylein erwiesen sich dagegen als wertlos. Die Tiere fraßen das Propioninfutter und starben alle innerhalb 1 bis 3 Tagen. Isovalerin wirkte giftig, so daß die Tiere zugrunde gingen, ohne das Futter vollständig aufzufressen. Außerdem hat es stark bitteren Geschmack. Die Undecyleintiere starben innerhalb 2 bis 3 Stunden mit Paralysesymptomen. Beim Reduzieren der zugesetzten Menge auf 2,7 Proz. erwiesen sich Propionin und Isovalerin nicht mehr giftig. Undecylein entfaltete dagegen immer noch giftige Wirkung. Ferner wurde beobachtet, daß durch katalytische Reduktion des Undecyleins dargestelltes Undecylin nicht nur ungiftig, sondern auch nahrhaft war. Die giftigen Eigenschaften des Undecyleins sind deshalb auf die ungesättigte Bindung im Molekül

zurückzuführen. Margarin und Stearin hatten kaum merkbare Wirkung, während Palmitin viel besser ausgenutzt wurde (Abb. 1).

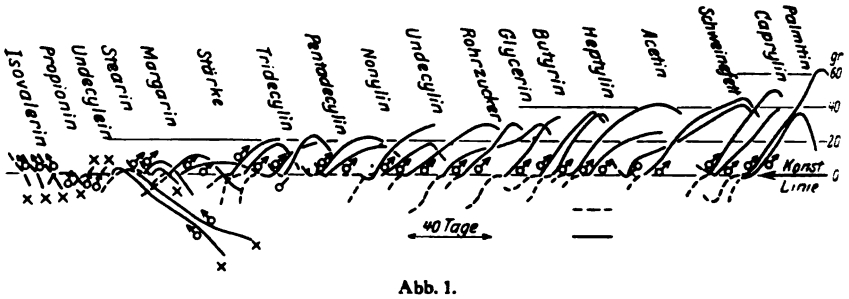


Abb. 1.

Fütterungsversuche mit synthetischen Fetten, die aus Fettsäuren von ungeraden Kohlenstoffatomen bestehen. Gewichtszunahme der Ratten nach dem Zusatz von je 5 Proz. der zu untersuchenden Fette zum Grundfutter.

Beim Zusatz von 10 Proz. Fett zum Grundfutter war die Gewichtszunahme in folgender Ordnung:

Caprylin . . . . 48,0 g	Heptylin . . . 37,0 g	Butyrin . . . 33,5 g
Pentadecylin . 32,0 g	Palmitin . . . 31,5 g	Tridecylin . . 23,5 g
Stearin . . . . 23,5 g	Acetin . . . . 21,5 g	Nonylin. . . . 14,0 g
	Margarin . . . 14,0 g	

Propionin, Isovalerin und Undecylein wurden hier nicht untersucht, weil sie schon mit 5 Proz. giftig wirkten (Abb. 2).

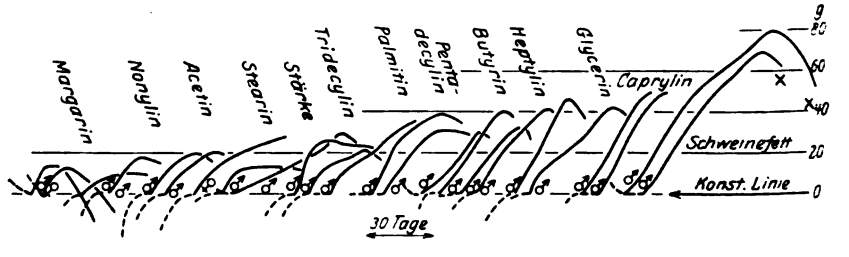


Abb. 2.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 10 Proz. der Fette zum Grundfutter.

Mit 20 Proz. war die Gewichtszunahme in folgender Ordnung:

Tridecylin . . 29,5 g	Pentadecylin . 20,0 g
Heptylin . . . 20,0 g	Stearin . . . . 4,0 g

Acetin, Caprylin, Tridecylin, Pentadecylin, Margarin und Stearin wirkten bei 10 Proz. besser als bei 5 Proz. Bei Nonylin, Butyrin und Palmitin war es umgekehrt. Acetin zeigte bei 15 Proz. schädliche Wirkung. Butter- und Schweinefett, besonders das erstere, wirkten in jeden Mengen-

verhältnissen sehr günstig. Das Wachstum der Tiere war fast proportional der steigenden Futtermenge (Abb. 3).

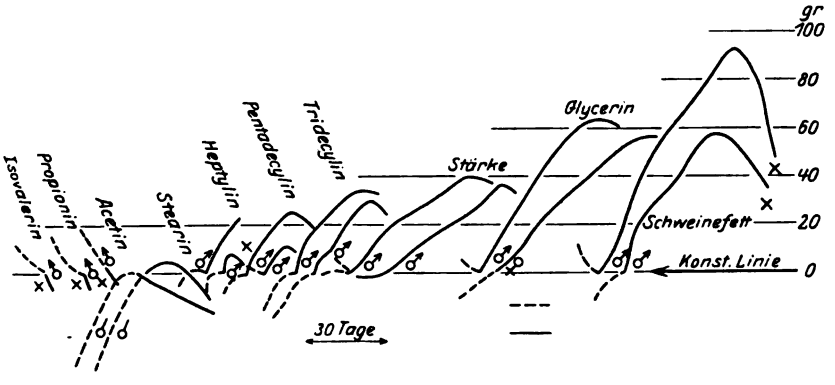


Abb. 3.
Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 20 Proz. der Fette zum Grundfutter.

Unter den drei Kohlehydraten war Glycerin am besten. Rohrzucker stand in der Mitte, während Stärke stets ungünstiger als die beiden anderen war. Sie hatten aber keine giftige Wirkung und das Wachstum war beinahe proportional der zugesetzten Menge derselben.

Zusammenfassung.

1. Es gibt keine regelmäßige Beziehung zwischen dem Nährwert und der Kohlenstoffzahl der Fette.

2. Im allgemeinen haben die Fette mit ungeraden Kohlenstoffatomen niedrigeren Nährwert als die natürlichen Fette.

Unter den ungeraden Fetten ist Heptyrin am besten, während Propionin, Isovalerin und Undecylein sich als giftig erweisen.

3. Das durch katalytische Reduktion des Undecyleins dargestellte Undecylin ist nicht nur ungiftig, sondern fördert das Wachstum des Tieres.

4. Stearin und Margarin werden immer schwer ausgenutzt, obgleich sie anscheinend nicht schädlich wirken.

5. Es ist kein Grund vorhanden, Margarin (Intervin) als Ersatz der natürlichen Fette dem Diabetiker zu empfehlen.

II. Über den relativen Nährwert der synthetischen Fette, die aus Oxyfettsäuren bestehen.

Oxyfettsäuren, mit Ausnahme von Ricinoleinsäure, kommen in natürlichen Fetten nur in geringer Menge vor, daher scheinen sie nur eine unbedeutende Rolle im Haushalt des tierischen Lebens zu spielen. Aber nach der bekannten *Knoop*schen Theorie werden die β-Oxysäuren stets als Zwischenstufe der oxydativen Spaltung des Fettes gebildet und weiter zu niederen Gliedern gespalten.

Auch ist es nicht ausgeschlossen, daß andere Oxysäuren beim Umsatz des Fettes gebildet werden, daher beabsichtigt der Verfasser, durch Fütterungsversuche mit verschiedenen Oxyfetten gewisse Anhaltspunkte für die Erklärung des Mechanismus des Fettstoffwechsels zu gewinnen.

Zu diesem Zwecke wurden 13 Oxyfettsäuren rein dargestellt. Die Schmelz- und Siedepunkte sowie die Molekulargewichte derselben wurden sorgfältig kontrolliert.

Die Darstellung der Triglyceride aus diesen Oxysäuren wurde mittels *Twitchells* Reagens genau nach der Angabe der ersten Mitteilung[1]) ausgeführt. Das Lactin, Dioxyundecylin, Dioxystearin und Trioxystearin konnte man jedoch nicht nach diesem Verfahren darstellen, weil sie beim Erhitzen mit *Twitchells* Reagens leicht dehydriert und weiter zersetzt werden. Deshalb wurden sie vorher acetyliert und mit Glycerin gekuppelt.

Die Tierversuche wurden auch mit Gemischen von Oxysäuren und Glycerin ausgeführt. Ferner wurden die Nährwerte des Ricinoleins, Acetylricinoleins und Ricinoelaidins miteinander verglichen.

Die Versuchsmethode war auch genau dieselbe wie in der ersten Mitteilung, nämlich die jungen Ratten von 40 bis 100 g wurden vorher mit einer beschränkten Menge des Grundfutters (9 g pro Tag) gefüttert. Wenn das Wachstum zum Stillstand kam, wurde das Grundfutter mit je 5, 10 und 20 Proz. der zu untersuchenden Fette versetzt. Die dadurch hervorgerufene Gewichtszunahme wurde als Maßstab des Nährwerts angenommen. Die Versuche wurden natürlich in derselben Zeit unter möglichst gleichen Bedingungen vorgenommen. Die folgenden Versuchsergebnisse wurden erhalten:

1. Beim Zusatz von je 5 Proz. der verschiedenen Fette zum Grundfutter wurde die Gewichtszunahme in folgender Ordnung erzielt:

1. Acetylricinolein	13,5 g	2. Ricinolein	4,5
3. Di-acetoxystearin . . .	4,5 g	4. α-Oxystearin	3,0 g
5. 1, 2-Oxystearin.	2,5 g	6. α-Oxypalmitin	2,0 g
7. Milchsäure + Glycerin .	1,5 g	8. Trioxystearinsäure + Glycerin	1,5 g
9. Monolactin	1,0 g	10. Dioxyundecylsäure + Glycerin	1,0 g
11. Triacetoxystearin*		12. Dioxystearinsäure* + Glycerin	
13. Di-acetoxyundecylin*		14. α-Oxyheptylin*	
15. α-Oxymyristin*		16. Ricinoelaidin*	

Die mit * bezeichneten Fette förderten das Wachstum nicht, und viele von ihnen erwiesen sich sogar als stark giftig.

[1]) Proc. Imp. Acad. 2, Nr. 1, 1926.

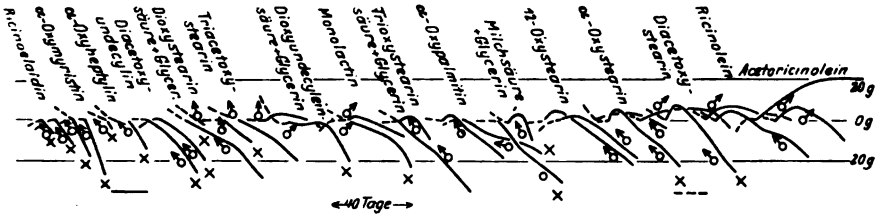


Abb. 4.

Fütterungsversuche mit synthetischen Fetten, die aus Oxyfettsäuren bestehen. Gewichtszunahme der Ratten nach dem Zusatz von je 5 Proz. der Fette zum Grundfutter.

2. Beim Zusatz von je 10 Proz. der verschiedenen Fette zum Grundfutter dagegen:

1. Acetylricinolein . . . . 58,5 g
2. 1, 2-Oxystearin . . . . . 24,5 g
3. Dioxystearinsäure + Glycerin . . . . . 19,0 g
4. Monolactin . . . . . 19,0 g
5. Diacetoxystearin . . . . 18,5 g
6. α-Oxystearin . . . . . 17,0 g
7. α-Oxystearinsäure + Glycerin . . . . . 7,0 g
8. α-Oxypalmitin . . . . . 4,0 g
9. Ricinolein . . . . . 3,0 g
10. Dioxyundecylsäure* + Glycerin
11. Trioxystearinsäure* + Glycerin
12. Ricinoelaidin*
13. Triacetoxystearin*
14. Diacetoxyundecylin*
15. Milchsäure + Glycerin*
16. α-Oxyheptylin*
17. α-Oxymyristin*

Die mit * bezeichneten Fette förderten das Wachstum nicht, und viele von ihnen erwiesen sich sogar als stark giftig.

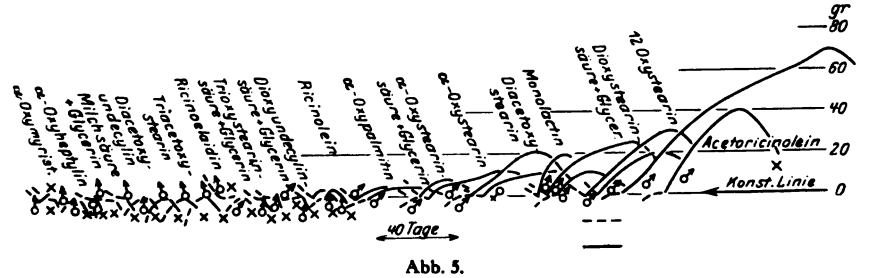


Abb. 5.

Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 10 Proz. der Fette zum Grundfutter.

3. Beim Zusatz von 20 Proz. der Fette zum Grundfutter:

1. Acetylricinolein . . . . 63,0 g
2. Dioxystearinsäure + Glycerin . . . . . 18,0 g
3. 1, 2-Oxystearin . . . . 16,5 g
4. Diacetoxystearin . . . . 4,5 g
5. α-Oxystearin . . . . . 2,5 g

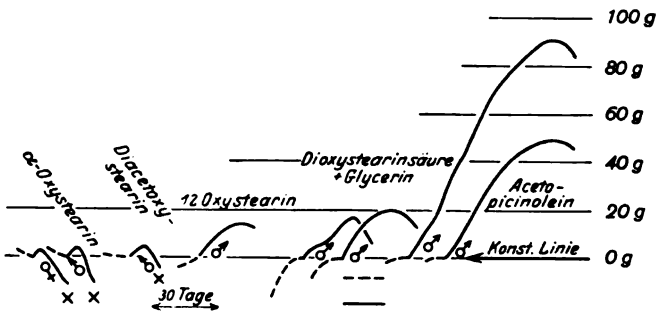


Abb. 6.
Gewichtszunahme nach dem Zusatz von je 20 Proz. der Fette zum Grundfutter.

Besonders interessant ist die Tatsache, daß Acetylricinolein bedeutend besser als Ricinolein ist. Auch 1, 2-Oxystearin, welches durch Hydrierung des Ricinoleins dargestellt wurde, ist viel besser als Ricinolein selbst. Nach wiederholten Versuchen kam der Verfasser zu der Annahme, daß die Spaltung der langen Kette des Ricinoleins anders verläuft als die des Acetylricinoleins oder des 1, 2-Oxystearins. Die gebildeten Produkte müssen sich natürlich anders verhalten. Die Spaltung geschieht am wahrscheinlichsten nach folgendem Schema:

(1) $C_6H_{13}CH(OH)CH_2.CH:CH(CH_2)_7COOH$
Rizinoleinsäure $\rightarrow C_6H_{13}CHO + CH_3CH:CH(CH_2)_7COOH$
Oenanthol Δ^9-Undecylensäure

(2) $C_6H_{13}CH(O.COCH_3)CH_2CHCH(CH_2)_7COOH$
Acetylricinolein $\rightarrow C_6H_{13}CH(O.CO.CH_3)CH_2.CH-$
$+-CH(CH_2)_7COOH$

(3) $C_6H_{13}CH(OH)CH_2CH_2CH_2(CH_2)_7COOH$
1, 2-Oxystearin $\leftarrow C_6H_{13}CHO + CH_2CH_2(CH_2)_7COOH$
Oenanthol Undecylsäure

Die aus Ricinolein gebildete Δ^9-Undecyleinsäure ist giftig, wie der Verfasser im vorigen Experiment nachgewiesen hat. Die anderen Produkte aus Acetylricinolein und 1, 2-Oxystearin zeigen aber keine schädliche Wirkung.

Es scheint, daß die Kette der Fettsäuren zuerst an der Stelle gespalten wird, wo die Hydroxylgruppe oder Doppelbindung vorhanden ist. Im letzteren Falle sollten zuerst zwei Hydroxylgruppen durch Oxydation entstehen, bevor sie weiter gespalten werden.

Ferner wurde beobachtet, daß verschiedene Kohlenhydrate verschiedene Nährwerte haben, obgleich die Differenz unter ihnen nicht so groß wie bei Fetten ist.

Faßt man nun die oben erwähnten Ergebnisse zusammen, so kommt man zu folgendem Schluß:

1. Die Nährwerte der Fette, die aus Oxyfettsäuren bestehen, sind mehr von der Stelle der Hydroxylgruppe als von der Zahl der Hydroxylgruppen im Molekül abhängig. So verhält sich z. B. α-Oxystearin ganz anders als 1, 2-Oxystearin.

2. Die Fette von α-Oxysäuren sind minderwertiger als die der entsprechend gesättigten Fettsäuren. So ist es nicht wahrscheinlich, daß die α-Oxydation im Organismus stattfindet.

3. Die schädliche Wirkung der α-Oxysäuren vermindert sich mit der Zunahme des Molekulargewichts, so sind z. B. α-Oxypalmitin oder α-Oxystearin weniger giftig als α-Oxyheptylin oder α-Oxymyristin.

4. Der Nährwert des Ricinoleins wird durch Acetylieren bedeutend erhöht. Bei Dioxyundecylin, Dioxystearin und Trioxystearin ist dies aber nicht der Fall. Der Grund, warum Acetylricinolein (und 1, 2-Oxystearin) höheren Wert hat als Ricinolein, ist wahrscheinlich darin zu suchen, daß es andere Spaltungsprodukte liefert als Ricinolein.

5. Ricinolein ist besser als sein festes Stereoisomer Ricinoelaidin.

Ernährungslehre und Variationsstatistik.

I. Mitteilung:

Über die chemische Zusammensetzung der Weizenkörner.

Von

L. Berczeller und **H. Wastl.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 10. August 1926.)

Solange man in der Ernährungslehre lediglich die Veränderungen der Nahrungsmittel im lebenden Organismus einer quantitativen Untersuchung unterzogen hat, konnte man sich mit den Einzelanalysen der zur Untersuchung herbeigezogenen Nahrungsmittel bzw. mit den Mittelwerten verschiedener Proben gleichartiger Nahrungsmittel begnügen. Man hatte ja das Hauptaugenmerk auf chemisch ziemlich gleichartige Vorgänge gerichtet, und dabei verschwanden die spezifischen Unterschiede zwischen den Nahrungsmitteln, welche in eine gleiche Gruppe gehören (z. B. Zerealien, Fleisch, Milch, Eierarten usw.), gar nicht zu reden von den individuellen Unterschieden der einzelnen Glieder derselben Gruppen (Weizen-, Roggenarten, verschiedene Fleischsorten derselben Tierart usw.). In der Praxis der menschlichen Ernährung ist nun allerdings schon lange bekannt, daß diesbezüglich sehr wesentliche Unterschiede vorhanden sind, und es hat sich eine empirische Wertung ausgebildet, welche in vielen Fällen zu einer merkwürdigen nachträglichen physiologischen Erklärung durch die Tierversuche in der Auffindung von „Vitaminen" oder sonstigen spezifischen Unterschieden zwischen ähnlichen Nahrungsmitteln (z. B. Leguminosen) geführt hat. Wir müssen daher einmal mit der alten Tradition brechen, daß wir Eiweiß, Fett, Kohlehydrate und Kalorien essen, da durch diese

Begrenzung der Bestandteile einer Nahrung die Bedeutung eines Nahrungsmittels noch lange nicht erfaßt ist.

Diese Untersuchungen machen es aber notwendig, daß wir uns einen genaueren Überblick über die chemischen und physikalischen Eigenschaften der einzelnen Nahrungsmittel verschaffen und uns nicht damit begnügen, mehr oder weniger willkürlich bestimmte Mittelzahlen für die chemische Zusammensetzung der Nahrungsmittel anzunehmen. Es ist ja diesbezüglich bekannt, daß infolge der Annahme der Gleichheit verschiedener Sorten desselben Nahrungsmittels langdauernde Ernährungsversuche ganz differente Resultate ergaben. Nur ein zusammenfassender und tiefer eindringender Überblick über die chemische Zusammensetzung der einzelnen Nahrungsmittel ermöglicht es, die geeigneten chemischen Grenzen des biologischen Ernährungsversuchs anzugeben, zwischen denen die einseitigen Fütterungsversuche auszuführen sind, um Zufälligkeiten bei dem Ausfall dieser Versuche auszuschließen.

Für viele Nahrungsmittel sind die Analysendaten vorhanden, auf Grund welcher mit Hilfe der variationsstatistischen Methoden eine *genauere* Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung möglich ist als jene, welche man erhält, wenn man bloß die Mittelwerte der Zusammensetzung berechnet.

Diese Untersuchungen haben aber nicht nur theoretisches Interesse, indem man dadurch eine bessere Unterlage für die ernährungsphysiologischen Versuche gewinnt, sondern sie haben auch für praktische Zwecke der menschlichen Ernährung ihre Wichtigkeit. Das immer mehr ausgeprägte Ziel der Mehrproduktion von Nahrungsmitteln verändert jedenfalls auch die biologische Qualität der Nahrung des Menschen. Eine Mehrproduktion an Weizen[1]) bedeutet keinesfalls so viel, daß alle Eigenschaften in gleichmäßigem Sinne in gleichem mehrfachen Verhältnis in dem neuen Samen zunehmen. Es wäre ein reines Wunder, wenn die für den Menschen als Konsumenten wichtigen Eigenschaften mit den für den Produzenten wichtigen Eigenschaften immer Schritt halten würden. Wenn der Mensch, durch Instinkt geleitet, immer das für ihn absolut Gute in der Ernährung finden würde, so wäre er gegenüber den eventuell ungünstigen Wandlungen in der Ernährung geschützt. Nun kann dies nicht einmal das viel zweckmäßiger wählende Tier durchführen, um so weniger der in der Nahrungswahl viel ungünstiger gestellte Mensch.

Der Ernährungslehre kommt daher die Aufgabe zu, die Nahrungsmittel, insbesondere jene des Menschen, genau zu charakterisieren, so

[1]) Durch züchterische Auslese unter den verschiedenen Weizensorten.

daß wir Standardwerte besitzen und dadurch jeden Wandel mit der Zeit nachweisen können. Wenn man die diesbezügliche Literatur durchsieht, muß man sich wundern, wie wenig Material zur Verfügung steht.

Obzwar in der Pflanzenphysiologie und in der Vererbungslehre und auch in der Pharmakognosie infolge der Arbeiten von *Rosenthaler*[1]) die variationsstatistische Untersuchungsmethodik eine ausgedehntere Verwendung findet, wurde die chemische Zusammensetzung der Nahrungsmittel kaum einer derartigen Untersuchung unterworfen. Es ist bekannt, daß man mehr oder minder wesentliche chemische Unterschiede zwischen verschiedenen Weizenarten oder Weizen von Ländern verschiedener Herkunft gefunden hat; dennoch aber hat man für die genauere Charakterisierung dieser Unterschiede nicht die variationsstatistischen Methoden herangezogen. So wurde insbesonders ein genaues Zahlenmaterial für die Charakterisierung des ungarischen *(Kossutány)* und rumänischen Weizens *(Zaharia)* gesammelt. Diese Untersuchungen wurden von uns für die folgenden Berechnungen als Ausgangsmaterial benutzt. Für die Anfangsuntersuchungen scheint es nämlich viel zweckmäßiger, wenn man das gleichmäßig analytisch behandelte Material *eines* Untersuchers verwendet, als wenn man auch die Variationsmöglichkeit infolge verschiedener Methoden mehrerer Forscher in Betracht ziehen muß. Insbesondere die Untersuchungen von *Zaharia* liefern uns ein sehr ausgiebiges Analysenmaterial. Der Autor hat 6 Jahre hindurch in einem weiten Weizengebiet (Altrumänien) Untersuchungen über die Beschaffenheit des Weizens durchgeführt und mit einer sehr großen Zahl von Einzelanalysen belegt, so daß das Material für variationsstatistische Untersuchungen sehr geeignet ist. Dieses Beispiel gewinnt noch an Interesse, wenn man dazunimmt, daß die pflanzlichen Produkte eine im allgemeinen größere Variabilität als die tierischen aufweisen. Die Untersuchung der Variabilität der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Weizens gibt uns also die Variabilität des maximal variierenden Nahrungsbestandteils an, zugleich aber auch die Variabilität des quantitativ größten Bestandteils der menschlichen Nahrung in seinen wichtigsten Eigenschaften.

Die Untersuchungen wurden auf die von *Zaharia* untersuchten Eigenschaften des Weizens ausgedehnt.

---

[1]) *L. Rosenthaler*, diese Zeitschr. **184**, 225, 1922; **186**, 482, 1923; Apotheker-Ztg. **24**, 1909, Nr. 74; Ber. d. d. pharm. Ges., Jahrg. 30, S. 392, 1920; Jahrg. 31, S. 395, 1921; Jahrg. 32, S. 237, 1922; Jahrg. 33, S. 1 und 2. 1923; Jahrg. 33, S. 255, 1923; Arch. d. Pharm. 1924, H. 1 (zweite Mitteilung); *S. Blume* (bei Prof. *Rosenthaler*), diese Zeitschr. **187**, 125, 1923.

Fett-, Eiweiß-, Cellulose-, Aschegehalt (in der Trockenstubstanz), Hektolitergewicht, Körnergröße, Mehligkeit[1]).

Die Untersuchungen von *Zaharia*[2]) liefern folgende Zahlen von Weizenproben in den einzelnen Jahren:

Jahr	Zahl von Weizenproben	Jahr	Zahl von Weizenproben
1900	485	1903	519
1901	386	1904	721
1902	775	1905	992

so daß sicherlich sehr wenige variationsstatistische Untersuchungen, insbesondere was die chemische Zusammensetzung von pflanzlichen oder tierischen Produkten betrifft, ein größeres Material betreffen. In dieser Beziehung beanspruchen diese Untersuchungen ein viel allgemeineres Interesse, als ihnen bis jetzt zuteil wurde.

Bei vielen variationsstatistischen Untersuchungen bedeutet es einen großen Mangel, daß nur die Endresultate der Rechnungen angegeben werden; dadurch hat meistens der Nachuntersucher nicht mehr die Möglichkeit, die Daten für seine eigenen Zwecke benutzen zu können. Deswegen haben wir nach Möglichkeit die Originalreihen, die aus der Aufarbeitung der *Zaharia*schen Arbeiten sich ergaben, mitgeteilt; aus demselben Grunde haben wir auch nicht in Kurvenform die Variation der einzelnen Bestandteile angeführt, wenn auch dies anschaulicher wäre als die statistischen Tabellen. Diese sind jedoch als Material auch für weitere Vergleiche in dieser Form viel wertvoller.

In Tabelle I ist die chemische Zusammensetzung des Weizens für die ganze Periode von 1900 bis 1905 aus den gesamten Analysen von *Zaharia* zusammengestellt angegeben.

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß die einzelnen Eigenschaften des Weizens eine ganz verschiedene absolute wie auch relative Variationsbreite aufweisen, wie auch, daß die Häufigkeit der Werte einen ganz differenten Verteilungstypus besitzt. Was zunächst die *Variationsbreite* betrifft, so sehen wir, daß bei Eiweiß der Maximalwert das 2,5fache des Minimalwertes beträgt, bei Fett das 1,8fache, bei Cellulose das 2,0fache und bei der Asche das 2,2fache. Die *häufigsten Werte (Mode)* sind bei Eiweiß 13,5 Proz., Fett 1,85 Proz., Cellulose 2,65 Proz. und Asche 2,05 Proz. Diese Werte sind in sehr verschiedener Entfernung bei den einzelnen chemischen Eigenschaften von den Grenzen der

---

[1]) Die wasserlöslichen Extraktstoffe wurden von *Zaharia* nur berechnet und sind in die Berechnung nicht eingezogen.

[2]) *Al. Zaharia*, Le blé roumain. Récoltes des Années 1900 bis 1908. Publié par le Ministère de l'Agriculture et des Domaines. Annexe au Bulletin du Ministère, XXI ème Année, No. 9 bis 10. Bucarest 1910. 581 Seiten.

Tabelle I.

Chemische Zusammensetzung der Weizenkörner (mittlere Kurven) (1900 bis 1905).

Eiweiß		Fett		Cellulose		Asche	
Proz. (Klassenmitte)	Zahl der Fälle	Proz. (Klassenmitte)	Zahl der Fälle	Proz. (Klassenmitte)	Zahl der Fälle	Proz. (Klassenmitte)	Zahl der Fälle
8,5	1	1,45	1	1,65	2	1,35	6
9,5	41	1,55	48	1,75	1	1,45	27
10,5	291	1,65	508	1,85	5	1,55	65
11,5	550	1,75	959	1,95	20	1,65	171
12,5	762	1,85	*1019*	2,05	90	1,75	291
13,5	*781*	1,95	794	2,15	180	1,85	465
14,5	574	2,05	348	2,25	262	1,95	634
15,5	406	2,15	105	2,35	446	2,05	*816*
16,5	232	2,25	21	2,45	519	2,15	659
17,5	123	2,35	7	2,55	556	2,25	437
18,5	64	2,45	4	2,65	*587*	2,35	170
19,5	18	2,55	2	2,75	499	2,45	62
20,5	8	2,65	1	2,85	374	2,55	19
21,5	3			2,95	190	2,65	13
				3,05	75	2,75	3
				3,15	34	2,85	3
				3,25	8	2,95	2
				3,35	1		
Relative Variationsbreite	2,53		1,83		2,03		2,18

Variationsbreite entfernt. Bei Eiweiß-, Fett- und Aschegehalt liegt der häufigste Wert dem Minimalwert näher, und zwar ist diese Asymmetrie besonders bei dem Fettgehalt ausgesprochen, dagegen zeigt der Cellulosegehalt eine entgegengesetzte Asymmetrie, indem der häufigste Wert dem Maximalwert näher liegt.

In der Nähe der häufigsten Werte zeigen die in symmetrischen Punkten befindlichen Werte meist an dem dem unteren Grenzwert näher liegenden Punkte die höheren Werte, nur bei der Asche bildet der dem häufigsten Wert näherliegende Punkt diesbezüglich eine Ausnahme. Diese Eigenschaft der Kurven zeigt es ganz deutlich, daß die beobachteten Asymmetrien sehr wesentliche und nicht zufällige Vorkommnisse sind.

Die Unähnlichkeit der Verteilungskurven für die einzelnen Bestandteile beweisen auch die verschiedenen Werte an den häufigsten Stellen. Den höchsten Prozentsatz aller Fälle (mittlere Kurve) finden wir an der Stelle des häufigsten Wertes bei Fett, wo 26,7 Proz. aller Fälle auf diese Stelle gehäuft sind, danach folgt Aschegehalt mit 21,2 Proz. aller Fälle, Eiweißgehalt mit 20,3 Proz., und die geringste Anzahl aller Fälle ist bei dem Cellulosegehalt mit 15,3 Proz. an der Stelle der häufigsten Werte vereinigt. Ein Vergleich dieser Werte mit den Variationsbreiten ergibt sofort die großen Unterschiede zwischen den

Häufigkeitskurven, indem die beiden Reihen nicht in entgegengesetzter Richtung sich verändern, sondern „Eiweiß" und „Cellulose" vertauschen ihre Plätze.

Variationsbreite: Eiweiß > Cellulose > Asche > Fett;
Häufigkeitszahl: Cellulose > Eiweiß > Asche > Fett.

Bevor eine nähere Analyse der Variationskurven versucht wird, soll auf Grund der einzelnen Jahresdaten zunächst geprüft werden, inwiefern diese die Endresultate der mittleren Häufigkeitskurven (Tabelle I) beeinflussen, um daraus ersehen zu können, inwieweit ein Material von etwa 4000 Analysenreihen in 6 Jahren für die Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung genügt. Die einzelnen chemischen Eigenschaften werden jedoch zunächst für sich behandelt werden.

I. Eiweißgehalt der Weizenkörner (Tabelle II).

Die häufigsten Werte sind in 4 Jahren dem Mittelwert entsprechend bei 13,5 Proz. Im Jahre 1904 ist der häufigste Wert 12,5 Proz. und 1902 sogar 11,5 Proz. Die Variationsbreite schwankt zwischen minimal dem 1,86fachen bis maximal dem 2,29fachen Minimalwerte des Eiweißgehalts. Der häufigste Wert liegt, ebenso wie bei der mittleren Kurve, ganz regelmäßig dem Minimalwert näher. Jedoch unterscheiden sich die einzelnen Jahreskurven sehr wesentlich darin, wie weit der Minimalwert sich vom häufigsten Werte entfernt.

Tabelle II.

Eiweißgehalt der Weizenkörner.

Eiweiß (Klassenmitte) Proz.	Zahl der Fälle						Σ (Mittl. Kurve)	Verteilung berechnet in Proz. der Gesamtanalysenzahl						Σ
	1900	1901	1902	1903	1904	1905		1900	1901	1902	1903	1904	1905	
8,5			1				1			0,1				0,03
9,5	5		19		16	1	41	1,1		2,4		2,2	0,1	1,1
10,5	40	2	155	2	71	21	291	8,3	0,5	19,5	0,4	10,0	2,1	7,5
11,5	76	19	*216*	17	100	122	550	15,8	5,0	*27,2*	3,4	14,0	12,4	14,3
12,5	102	60	184	75	*103*	238	762	21,2	15,9	23,2	14,8	*14,5*	24,2	19,8
13,5	*110*	*88*	95	*131*	102	*255*	*781*	*22,8*	*23,3*	12,0	*25,9*	14,3	*26,0*	*20,3*
14,5	62	67	57	122	91	175	574	12,8	17,7	7,2	24,1	12,8	17,8	14,9
15,5	57	68	34	88	76	83	406	11,9	18,0	4,3	17,4	10,7	8,5	10,5
16,5	19	42	13	38	60	60	232	3,9	11,1	1,6	7,5	8,4	6,1	6,0
17,5	8	19	13	24	44	15	123	1,7	5,0	1,6	4,7	6,2	1,5	3,2
18,5	2	9	4	4	38	7	64	0,4	2,4	0,5	0,8	5,3	0,7	1,6
19,5		4	2	2	6	4	18		1,1	0,25	0,4	0,8	0,4	0,5
20,5	1			2	5		8	0,2			0,4	0,7		0,25
21,5				1	2		3				0,2	0,3		0,08
Relat. Variationsbreite	2,16	1,86	2,29	2,05	2,26	2,05	2,53							

Die in der mittleren Kurve beobachtete größere Anhäufung der Werte in dem Bereich, welches zwischen dem dem häufigsten Punkt benachbarten Gebiet in der Richtung des Minimalwerts liegt, ist lediglich darauf zurückzuführen, daß einzelne Jahreskurven einen niedrigeren häufigsten Wert

zeigen, denn nur im Jahre 1900 und 1905 sind auch bei den Jahreskurven die Wertverteilungen gleich, dagegen in den anderen 4 Jahren genau umgekehrt.

Sehr variierend ist der Prozentsatz aller Fälle, welche den häufigsten Wert bilden. Die höchste Zahl der Fälle kommt im Jahre 1902 mit 27,2 Proz. aller Fälle vor, die niedrigste Zahl mit 14,5 Proz. im Jahre 1904. Es muß zugleich bemerkt werden, daß diese Zahl auch nicht in einfachem Zusammenhang mit der Variationsbreite ist, da eben in diesen beiden Jahren hohe Werte der Variationsbreiten vorkommen, welche sich zugleich voneinander kaum unterscheiden und trotzdem diese am meisten divergierenden Werte in der relativen Anzahl der Fälle im häufigsten Wert sich ergeben.

II. Fettgehalt der Weizenkörner (Tabelle III).

Die *häufigsten Werte* der Jahreskurven entsprechen nicht der Mehrzahl nach dem häufigsten Wert der mittleren Kurve, sondern sind in drei nacheinander folgenden Jahren niedriger, in 2 Jahren entsprechen sie dem häufigsten Wert der mittleren Kurve und in einem Jahre sind sie höher. Das Variieren dieser Werte ist der Größenordnung nach ungefähr ebenso groß, wie bei Eiweiß. Die *Variationsbreiten* verändern sich zwischen 1,42 bis 1,65, sind also, ebenso wie bei den mittleren Kurven, viel niedriger als

Tabelle III.

Fettgehalt der Weizenkörner.

Fett (Klassenmitte) Proz.	Zahl der Fälle						Σ (Mittl. Kurve)	Verteilung berechnet in Proz. der Gesamtanalysenzahl						Σ
	1900	1901	1902	1903	1904	1905		1900	1901	1902	1903	1904	1905	
1,45			1				1			0,1				0,03
1,55	1	4	35	7	1		48	0,2	1,1	4,5	1,4	0,1		1,3
1,65	26	75	296	86	21	4	508	5,4	21,1	38,2	17,3	2,9	0,4	13,3
1,75	146	*139*	*308*	*157*	162	47	959	30,3	*37,0*	*39,8*	*31,5*	22,6	4,7	25,1
1,85	*178*	104	120	124	*237*	256	*1019*	*36,9*	29,1	15,5	24,9	*33,1*	25,6	*26,7*
1,95	85	26	12	80	184	*397*	794	19,7	7,3	1,55	16,1	25,6	*40,1*	20,8
2,05	29	2	3	24	76	214	348	6,0	0,6	0,4	4,8	10,6	21,6	9,1
2,15	6	1		10	29	59	105	1,2	0,3		2,0	4,1	6,0	2,8
2,25		3		4	6	8	21		0,8		0,8	0,8	0,8	0,6
2,35	1			2		4	7	0,2			0,4		0,4	0,2
2,45		1		2		1	4		0,3		0,4		0,1	0,1
2,55		1		1			2		0,3		0,2			0,05
2,65				1			1				0,2			0,03
Relat. Variationsbreite	1,52	1,61	1,41	1,71	1,45	1,48	1,83							

die entsprechenden Werte bei Eiweiß. Außer der Jahreskurve von 1902, wo der häufigste Wert in gleicher Entfernung von dem Minimal- und Maximalwert liegt, ist der häufigste Wert in allen fünf anderen Fällen dem Minimalwert bedeutend näherliegend. Die bei der mittleren Kurve beobachtete größere Häufung der Fälle in dem in der Richtung der Minimalwerte liegenden Teile der Kurve ist wieder nicht regelmäßig bei den einzelnen Jahreskurven zu beobachten.

Der prozentuale Anteil der Fälle im häufigsten Punkte der Kurve verändert sich zwischen 31,5 bis 40,1 Proz. aller Fälle, ist also bedeutend höher als bei der mittleren Kurve aller Jahre, was eben darin seine Er-

klärung findet, daß der häufigste Wert von 3 Jahren außerhalb des häufigsten Wertes der mittleren Kurve fällt. In diesem Falle (bei Fett) fällt der niedrigste Prozentsatz der Einzelbeobachtungen in dem häufigsten Punkt mit der größten Variationsbreite zusammen (1903), jedoch ist auch hier kein einfacher Zusammenhang zwischen beiden Größen nachweisbar.

III. Cellulosegehalt der Weizenkörner (Tabelle IV).

Der *häufigste Wert* variiert zwischen 2,35 bis 2,75 Proz., und zwar so, daß auf 2,65 Proz. (häufigster Wert der Mittelkurve) nur ein Jahreswert fällt. Die *Variationsbreite* liegt zwischen 1,57 und 2,03. Die mittlere Kurve des Cellulosegehalts unterscheidet sich darin wesentlich von den anderen Kurven (Eiweiß, Fett, Asche), daß der häufigste Wert in diesem Falle dem Maximalwert näher liegt. Auch bei den Jahreskurven ist dieses Verhalten in vier Fällen nachweisbar, gegenüber zwei Fällen, wo das entgegengesetzte Verhalten zu beobachten ist. Der Prozentsatz der in den häufigsten Punkt fallenden Werte variiert zwischen 18,7 bis 23,0 Proz., wobei bemerkt werden muß, daß die Werte sich zwischen 19,6 bis 23,0 Proz. häufen, indem nur ein Jahreswert mit 18,7 Proz. vorkommt, alle fünf anderen Werte dagegen in der engeren Zone von 19,8 bis 23,0 Proz. liegen. Auch in dem Falle ist kein Zusammenhang zwischen Variationsbreite und relativer Zahl der Fälle im häufigsten Punkte nachweisbar.

Tabelle IV.

Cellulosegehalt der Weizenkörner.

Cellulose (Klassenmitte) Proz.	Zahl der Fälle						Σ (Mittl. Kurve)	Verteilung berechnet in Proz. der Gesamtanalysenzahl						Σ
	1900	1901	1902	1903	1904	1905		1900	1901	1902	1903	1904	1905	
1,65	1		1				2	0,2		0,1				0,02
1,75	1						1	0,2						0,03
1,85	1		2	1	1		5	0,2		0,2	0,2	0,1		0,1
1,95	3	3	9	4	1		20	0,6	0,8	1,2	0,8	0,1		0,5
2,05	37	5	27	17	3	1	90	7,6	1,3	3,5	3,5	0,4	0,1	2,3
2,15	49	28	67	28	6	2	180	10,5	7,2	8,8	5,7	0,8	0,2	4,7
2,25	70	45	86	36	20	5	262	14,4	11,7	11,2	7,3	2,8	0,5	6,8
2,35	83	61	*151*	42	71	18	446	17,0	15,8	*19,8*	8,5	10,0	1,8	12,1
2,45	*91*	*83*	131	77	95	44	519	*18,7*	*21,8*	17,1	15,6	13,4	4,0	13,5
2,55	67	70	101	*102*	128	88	556	13,8	18,1	13,2	*20,8*	18,0	8,9	14,5
2,65	45	44	118	76	*154*	150	*587*	9,2	11,4	15,4	15,4	*21,7*	15,1	*15,3*
2,75	23	26	42	64	116	*228*	499	4,7	6,7	5,5	13,0	16,3	*23,0*	13,0
2,85	8	12	18	32	83	221	374	1,6	3,1	2,4	6,5	11,7	22,3	9,7
2,95	3	6	6	4	19	152	190	0,6	1,5	0,8	0,8	2,7	15,3	4,9
3,05	2	3	2	9	10	49	75	0,4	0,8	0,2	1,8	1,4	7,9	1,9
3,15	3		2		3	26	34	0,6		0,2		0,4	2,6	0,9
3,25			1			7	8			0,1			0,7	0,2
3,35			1				1			0,1				0,03
Relat. Variationsbreite	1,91	1,56	2,03	1,65	1,70	1,59	2,03							

IV. Aschegehalt der Weizenkörner (Tabelle V).

Der *häufigste Wert* der mittleren Kurve fällt mit dem am meisten (dreimal) vorkommenden häufigsten Wert der Jahreskurven zusammen. Die häufigsten Werte variieren zwischen 1,85 bis 2,25 Proz. Die *Variations-*

breite liegt zwischen 1,65 bis 1,97. Der häufigste Wert liegt öfter dem Minimalwert, wie auch dies in der mittleren Kurve zu beobachten ist, näher. In vier Jahreskurven ist dieses Verhalten zu beobachten, hingegen in zwei Fällen das entgegengesetzte.

Der Prozentsatz der in dem häufigsten Punkte vorhandenen Fälle bewegt sich zwischen 21,4 bis 27,3 Proz.

Die bisher angeführten Eigenschaften sowohl der mittleren Kurve der 6 Jahre, wie der mittleren Jahreskurven zeigen es hinlänglich, daß die Verteilung der Werte *nicht* durch die Binomialkurve zu beschreiben ist, wie auch, daß die Jahreskurven charakteristische Merkmale der Verteilung aufweisen und die Variationsbreiten[1]) zweckmäßig für die Charakterisierung der Kurven herangezogen werden können.

Zunächst sollen nun die bisher behandelten Werte der Jahreskurven betreffend der einzelnen chemischen Eigenschaften, nach den charakteristischen Merkmalen gruppiert, zusammenfassend behandelt werden.

Tabelle V.

Aschegehalt der Weizenkörner.

Asche (Klassenmitte) Proz.	Zahl der Fälle						Σ (Mittl. Kurve)	Verteilung berechnet in Proz. der Gesamtanalysenzahl						Σ
	1900	1901	1902	1903	1904	1905		1900	1901	1902	1903	1904	1905	
1,35	5		1				6	1,0		0,1				0,2
1,45	15		3		8	1	27	3,1		0,4		1,1	0,1	0,7
1,55	13		7		37	8	65	2,7		0,9		5,2	0,8	1,7
1,65	26		33	1	79	32	171	5,4		4,0	0,2	11,1	3,3	4,4
1,75	34	4	64	4	121	64	291	7,1	1,0	8,8	0,8	17,1	6,5	7,6
1,85	67	13	120	23	*152*	90	465	13,9	3,3	15,7	4,4	*21,4*	9,2	12,1
1,95	76	43	184	67	133	131	634	15,8	11,0	24,1	12,9	18,8	13,4	16,5
2,05	*103*	84	*194*	116	92	*227*	*816*	*21,4*	21,5	*25,4*	22,3	13,0	*23,1*	*21,2*
2,15	80	89	96	*142*	54	198	659	16,6	22,8	12,5	*27,3*	7,6	20,2	17,1
2,25	37	*93*	38	94	13	162	437	7,7	*23,8*	5,0	18,1	1,8	16,5	11,4
2,35	18	34	13	47	8	50	170	3,7	8,7	1,7	9,0	1,1	5,1	4,4
2,45	5	16	9	19	5	12	62	1,0	4,1	1,2	3,7	0,7	1,2	1,6
2,55	1	4	2	5	5	2	19	0,2	1,0	0,3	1,0	0,7	0,2	0,5
2,65	2	5	1	1	2	2	13	0,4	1,3	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3
2,75		1				2	3		0,3				0,2	0,08
2,85		2		1			3		0,5		0,2			0,08
2,95		2					2		0,5					0,05
Relat. Variationsbreite	1,96	1,69	1,96	1,73	1,83	1,90	2,18							

[1]) Es kann an dieser Stelle nicht näher in theoretische Erörterungen betreffend die Verwendung von bestimmten Größen zur Charakterisierung der Verteilungsgrößen, wie überhaupt über die Methode der Beschreibung eingetreten werden. Die hier angegebenen Methoden wurden durch rein empirische Versuche, und zwar so ausprobiert, damit man in der elementarsten Weise in möglichst gut definierender Charakterisierung die einzelnen Verteilungskurven kennen soll, wobei zugleich eine möglichst große Sicherheit dafür gegeben werden soll, eine Kontrolle zu haben, es nicht mit Zufallserscheinungen zu tun zu haben. Eine theoretische Beleuchtung dieser Fragen wird an anderer Stelle durchgeführt werden.

A. Variationsbreite (Tabelle VI).

Zwischen den Variationsbreiten der einzelnen Jahre betreffend der verschiedenen Eigenschaften sind charakteristische Zusammenhänge zu beobachten. Die Variationsbreite wurde berechnet, indem die Differenz zwischen höchstem und geringstem Wert durch den höchsten Wert dividiert und der Quotient mit 100 multipliziert wurde.

1. Ganz regelmäßig wechseln Jahre mit größerer Variationsbreite mit Jahren mit geringerer Variationsbreite der chemischen Eigenschaften. Nur bei dem Aschegehalt und nur in der Nacheinanderfolge der Jahre von 1904 bis 1905 ist eine geringe Ausnahme zu beobachten, und bei dem Fettgehalt ist die Reihenfolge der Jahre eine umgekehrte wie bei den anderen Eigenschaften.

2. Die Reihenfolge der Variationsbreite der einzelnen Eigenschaften in den einzelnen Jahren zeigt große Regelmäßigkeit, wie dies die folgende Zusammenstellung zeigt:

1900:	Eiweiß	>	Asche	>	Cellulose	>	Fett
1901:	„	>	„	>	„	>	„
1902:	„	>	Cellulose	>	Asche	>	„
1903:	„	>	Fett	>	„	>	Cellulose
1904:	„	>	Asche	>	Cellulose	>	Fett
1905:	„	>	„	>	„	>	„

Von den untersuchten 6 Jahren kann man in 4 Jahren regelmäßig die Reihenfolge der Variationsbreiten beobachten, daß Eiweiß die größte, Asche die zweit größte, Cellulose die nächste und Fett die geringste Variationsbreite aufweist. Hingegen finden wir im Jahre 1902 eine Abweichung in der Art, wie die Cellulose zur Asche steht, obwohl die Reihenfolge dieselbe bleibt, und im Jahre 1903 ist die Variationsbreite von Fett vor die der Asche und Cellulose gerückt.

Zahlenmäßige quantitative Zusammenhänge lassen sich vorläufig aus der Variationsbreite nicht herauslesen, denn wo, wie in den Jahren 1903 und 1905, die Variationsbreiten für Eiweiß praktisch gleich sind (2,05 bzw. 2,06), verändern sich die Variationsbreiten von Cellulose und Asche in der entgegengesetzten Richtung und ebenso in den Jahren 1900 und 1902, in welchen die Variationsbreiten der Asche ganz gleich sind, dagegen fast gleich große gleichgerichtete Veränderungen der Variationsbreiten in Eiweiß und Cellulose nachweisbar sind.

Tabelle VI.

Breite der Variationskurven (höchster Wert = 100) der Weizenanalysen.

	Eiweiß	Fett	Cellulose	Asche	Bemerkungen
1900	53,7	34,1	47,6	49,1	$100\left(\frac{\text{Maximalwert} - \text{Minimalwert}}{\text{Maximalwert}}\right)$
1901	46,1	39,2	36,0	41,7	
1902	56,4	29,3	50,8	49,1	
1903	51,1	41,5	39,4	42,1	
1904	55,8	31,1	41,3	45,3	
1905	51,3	32,6	37,0	47,3	
Mittelwert = M	52,4	34,6	42,0	45,8	
MV = mittl. Kurve (Maximalvariation)	60,5	45,2	50,8	54,2	
Breite (Proz. der mittleren Kurve)	86,6	76,6	82,7	91,2	$\frac{M \cdot 100}{MV}$

B. Häufigste Werte (Tabelle VII).

Wie aus Tabelle VII ersichtlich ist, sind die in der Variationsbreite beobachteten Jahresschwankungen in den Veränderungen der häufigsten Werte nicht nachweisbar. Es sind zwischen den häufigsten Werten der verschiedenen Jahreskurven keine Gesetzmäßigkeiten nachzuweisen.

Tabelle VII.

Häufigste Werte der chemischen Eigenschaften.

Proz. (Klassenmitten)	1900	1901	1902	1903	1904	1905
Eiweiß	13,5	13,5	11,5	13,5	12,5	13,5
Fett	1,85	1,75	1,75	1,75	1,85	1,95
Cellulose	2,45	2,45	2,35	2,55	2,65	2,75
Asche	2,05	2,25	2,05	2,15	1,85	2,05

C. Prozentsätze der häufigsten Werte (Tabelle VIII).

In dem Prozentsatz der häufigsten Werte sind wieder ganz charakteristische, für die einzelnen chemischen Eigenschaften bzw. für die einzelnen Jahre kennzeichnende Eigenschaften nachweisbar.

Tabelle VIII.

Prozentsätze der häufigsten Werte.

Proz. (Klassenmitten)	1900	1901	1902	1903	1904	1905
Eiweiß	22,8	23,3	27,2	25,9	14,5	26,0
Fett	36,9	37,0	39,8	31,5	33,1	40,1
Cellulose	18,7	21,8	19,8	20,8	21,7	23,0
Asche	21,4	23,9	25,4	27,3	21,4	23,1

1. In allen Jahren weist *Fett* die höchsten Prozentsätze aller Fälle in dem häufigsten Werte auf. Diesbezüglich verändern sich Variationsbreite und Prozenzsatz aller Fälle im häufigsten Werte parallel, indem bei Fett die geringste Variationsbreite in den einzelnen Jahren (mit einer einzigen Ausnahme) zu beobachten war.

Ebenso können wir bei Cellulose den geringsten Wert aller Fälle in der häufigsten Gruppe beobachten. Nur eine einzige Ausnahme bildet diesbezüglich das Jahr 1904, wo aber sowohl Eiweiß wie Asche einen geringeren Prozentsatz in dieser Gruppe besitzen. Diesbezüglich gehen Variationsbreite und Prozentsatz der häufigsten Fälle vollständig auseinander, da Cellulose nach Fett eben die geringste Variationsbreite aufgewiesen hat.

Bei den in die zwei mittleren Gruppen fallenden Eiweiß- und Aschewerten zeigen dagegen regelmäßig bald die eine Gruppe, bald die andere Gruppe höhere Werte, wie dies aus folgender Zusammenstellung übersichtlich zu ersehen ist:

1900: Fett > Eiweiß > Asche > Cellulose
1901: „ > Asche > Eiweiß > „
1902: „ > Eiweiß > Asche > „
1903: „ > Asche > Eiweiß > „
1904: „ > Cellulose > Asche > Eiweiß
1905: „ > Eiweiß > Asche > Cellulose

2. Bei größeren Veränderungen der Werte ist es auch zu beobachten, daß bei allen vier chemischen Eigenschaften die Prozentsätze sich nach gleicher Richtung in verschiedenen Jahren verändern. Jedoch sind hier bereits wesentliche Abweichungen nachweisbar. Die Übersicht ermöglicht folgende Zusammenstellung:

	1900 1901	1901 1902	1902 1903	1903 1904	1904 1905	1900 1902	1900 1903	1900 1904	1900 1905	1901 1903	1901 1904	1901 1905	1902 1904	1902 1905	1903 1905
Eiweiß . .	g	g	k	k	g	g	g	k	g	g	k	g	k	k	g
Fett . . .	g	g	k	—	g	g	k	k	g	k	k	g	k	g	g
Cellulose .	g	k	g	g	g	g	g	g	g	k	g	g	g	g	g
Asche. . .	g	g	g	k	g	g	g	g	g	g	g	g	k	k	k

In der vorausgehenden Zusammenstellung bedeutet g = größer, wenn die Häufigkeitszahl in dem untenstehenden (folgenden) Jahre größer ist als im obenstehenden (vorangehenden) Jahre; k = kleiner.

Diese Zahlen ergeben zunächst das merkwürdige Resultat, daß es wahrscheinlicher ist, daß in nacheinander folgenden Jahren ein größerer Prozentsatz der häufigsten Fälle relativ öfters vorkommen wird, denn insgesamt (bei allen chemischen Eigenschaften) kommt es 41mal vor, daß in einem vorangehenden Jahre das Häufigkeitsprozent geringer und nur in 18 Fällen größer ist. Gleichheit kommt nur in einem Falle vor. Wenn wir also diesen gleichen Fall auch zu den 18 Fällen hinzugeben, kommt es in weniger als in der Hälfte der Fälle vor, daß die Häufigkeitszahl mit dem Vorschreiten der Jahre abnimmt. Zunächst könnte man daran denken, daß dies mit der verschiedenen Anzahl der Analysen zusammenhängt, indem mit Ausnahme der Jahre 1902 und 1903 die Anzahl der Analysen immer zunimmt. Dies ist jedoch nicht der Fall, denn die einzelnen chemischen Eigenschaften zeigen gleiches Verhalten in so verschiedenem Maße, daß dies in den einzelnen chemischen Eigenschaften beruhende Ursachen haben muß. Am meisten ausgeprägt ist diese systematische Veränderung bei Cellulose, wo 13mal die Zunahme in späteren Jahren gegen zweimalige Abnahme der Fall ist. Bei Asche beobachteten wir elf Zunahmen gegen vier Abnahmen, bei Eiweiß sind die entsprechenden Zahlen 9 zu 6 und bei Fett sind in acht Fällen Zunahme, in sechs Fällen Abnahme und in einem Falle Gleichheit der Werte nachzuweisen. Schon allein die Tatsache, daß eben Asche- und Cellulosegehalt parallele Veränderungen aufweisen, welchen die Veränderungen des Eiweißes am nächsten stehen, zeigt uns an, daß es sich hier nicht um zufällige, sondern systematische Verschiebungen der Zusammensetzung der Weizenkörner in einer so kurzen Periode, wie 6 Jahre es sind, handeln muß.

In einem Drittel aller möglichen Fälle ist vollkommen regelmäßig zu beobachten, daß alle Häufigkeitszahlen der chemischen Eigenschaften größer oder kleiner sind in einem Jahre. Von den insgesamt 15 Fällen sind außerdem noch fünf Fälle solche, wo nur eine Eigenschaft gegenüber der anderen eine Ausnahme bildet, und nur in drei Fällen sind die Veränderungen so, daß zwei Eigenschaften nach einer, die zwei anderen nach der entgegengesetzten Richtung sich verändern. Wenn wir also den einen absolut nicht einzuordnenden Fall (eine Eigenschaft gleich) zu den ungeordneten Fällen rechnen, ist in mehr als zwei Drittel der Fälle das Geordnetsein der Häufigkeitszahlen nach Jahren nachweisbar, was jedenfalls darauf hinweist, daß die Witterung in dem Zustandekommen der Häufigkeitszahlen von maßgebender Bedeutung ist.

Schon aus diesen Zahlen ist es auch ersichtlich, daß insbesondere das Jahr 1904 den größten Teil der Anomalien verursacht und man noch zu viel regelmäßigeren Reihen kommt, wenn man das Jahr 1904 ausschaltet. Da wir absolut keine Ursache zu einer solchen Ausschaltung haben und es nur von rechnerischem Vorteil wäre, soll dies nicht näher behandelt werden.

Zusammenfassung.

1. Die Verteilung sowohl des mittleren Vorkommens der Einzelwerte der chemischen Eigenschaften in dem Durchschnitt mehrerer Jahre, wie auch in dem Material eines Jahres geschieht beim Weizen *nicht* nach der Binomialkurve, sondern die Abweichungen hiervon sind ganz charakteristische.

2. Die relative Variationsbreite der Verteilung der untersuchten chemischen Eigenschaften ist beim Weizen eine verschiedene, für die einzelnen chemischen Eigenschaften charakteristische Größe, und zwar ist sie am geringsten beim Fett und am größten beim Eiweiß. Der Fettgehalt des Weizens ist also die charakteristischste, und der Eiweißgehalt die am wenigsten charakteristische Eigenschaft des Weizens.

3. Von den hier untersuchten drei Faktoren: Variationsbreite, häufigste Gruppe und relative Zahl der Fälle in der am häufigsten vorkommenden Gruppe bildet die Lokalisierung der am häufigsten besetzten Gruppe, den am wenigsten charakteristischen, sowie auch die wenigsten Regelmäßigkeiten aufweisenden Faktor.

4. Die Verteilungskurven der vier untersuchten chemischen Eigenschaften sind einander insofern ähnlich, als sie Kurven bilden, welche alle nur *einen* Maximalwert aufweisen. Jedoch sind diese Maximalpunkte bei den einzelnen chemischen Eigenschaften different und zeigen auch bestimmte Regelmäßigkeiten innerhalb einzelner Jahre.

5. Zwischen Variationsbreite und häufigstem Wert ist nur beim Fettgehalt ein Zusammenhang nachweisbar.

Ernährungslehre und Variationsstatistik.

II. Mitteilung:
Über die Korngröße und das Hektolitergewicht des Weizens.

Von

L. Berczeller und **H. Wastl.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 10. August 1926.)

In der ersten Mitteilung konnte gezeigt werden, daß die variationsstatistische Untersuchung der chemischen Eigenschaften des Weizenkorns interessante Aufschlüsse darüber geben kann, wie sich diese Eigenschaften verändern, wie groß die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens bestimmter chemischer Charaktere ist usw. Insbesondere ließ sich zeigen, daß bei den einzelnen chemischen Eigenschaften große Differenzen vorhanden sind, was die Häufigkeit der einzelnen Werte betrifft, welche die betreffende Eigenschaft unter sonst gleichen Bedingungen annehmen kann. Diese Untersuchungen sind nicht nur von theoretischem, sondern auch von großem praktischen Interesse, da eben auch praktisch (ernährungsphysiologisch wie nahrungsmitteltechnisch) sehr wertvolle Eigenschaften des Weizens großen Variationen unterworfen sein können. Um eine nähere Analyse dieser Erscheinungen zu ermöglichen, wurden jetzt die zwei wichtigsten physikalischen Eigenschaften (Korngröße und Hektolitergewicht) des Weizenkorns der variationsstatistischen Untersuchung unterworfen[1]).

---

[1]) Zu diesen Untersuchungen wurde das auch in der ersten Mitteilung benutzte große Analysenmaterial von *Zaharia* (Le blé roumain. Bukarest 1910, 581 Seiten) herangezogen. Bereits in der ersten Mitteilung wurde darauf hingewiesen, daß auf einer verhältnismäßig kleinen Fläche (Altrumänien) von Weizen ein größeres Analysenmaterial vorhanden ist, bei welchem insbesondere zufolge der großen Zahl der Analysen eine genauere Charakterisierung der einzelnen Proben möglich ist.

I. Die variationsstatistische Untersuchung der Korngröße.

Zaharia gibt das Gewicht von je 1000 Weizenkörnern an. Das durch 6 Jahre untersuchte Material *Zaharias*, von 1900 bis 1906, verteilt sich folgendermaßen (näheres siehe erste Mitteilung):

Tabelle I.

(Klassenmitte) 1000 Korn Gewicht (g)	16	18	20	22	24	26	28	30	32
Zahl der Fälle	1	3	4	30	78	170	291	500	675
Verteilung, berechnet zu Proz. der Gesamtanalysenzahl	0,03	0,08	0,1	0,8	2,0	4,4	7,6	13,1	18,0

(Klassenmitte) 1000 Korn (g) Gewicht	34	36	38	40	42	44	46	48	50
Zahl der Fälle	727	556	414	203	108	47	15	7	7
Verteilung, berechnet zu Proz. der Gesamtanalysenzahl	*19,0*	14,5	10,8	5,3	2,8	1,2	0,4	0,2	0,2

Insgesamt stehen also für diese Untersuchung 3836 Einzelanalysen zur Verfügung. Die Variationskurve der Korngröße zeigt ein Maximum bei 34 mg. Die Kurve zeigt, was das Maximum betrifft, einen sehr symmetrischen Aufbau. Bei keiner der chemischen Eigenschaften konnte diese Symmetrie beobachtet werden. Die relative Variationsbreite der Körnergröße beträgt 3,13 (maximale Korngröße/minimale Korngröße). Diese Zahl ist bedeutend größer als bei den chemischen Eigenschaften (bei diesem Material), es beträgt ja in dem Gesamtmaterial[1]) die relative Variationsbreite im Maximalwert (bei Eiweiß) 2,53 und im Minimalwert (bei Fett) 1,83. In der häufigsten Gruppe sind 19 Proz. aller Fälle enthalten. Mit den vier untersuchten chemischen Eigenschaften verglichen, ist dies ein hoher Wert, denn einen wesentlich höheren Prozentsatz aller Fälle haben wir nur bei Fett (mit 26,7 Proz.) beobachten können, wo aber die Variationsbreite eine viel geringere war. Hingegen zeigen die anderen drei chemischen Eigenschaften teils einen fast gleichen Prozentsatz der Fälle in dieser Gruppe (Eiweiß 20,3 und Asche 21,2 Proz.), teils Cellulose sogar einen viel geringeren, 15,3 Proz., wobei, wie erwähnt, auch diese eine viel kleinere (jedoch größer als Fett) Variationsbreite besitzt.

In Tabelle II sind die die einzelnen Jahre betreffenden Daten angeführt.

Der *häufigste Wert* liegt zwischen 32 bis 36 mg. Der häufigste Wert der Gesamtkurve liegt also eben in der Mitte der sechs Jahreswerte, von welchen je zwei in die einzelnen der drei Gruppen fallen, und zwar ist die Verteilung der Werte nach Jahren eine ganz regelmäßige, indem immer höhere und niedrigere Werte regelmäßig abwechseln. Die *Variationsbreiten* liegen zwischen 2,08 bis 3,13, sind also selbst sehr variabel. Die Veränderung der Variationsbreite war bei keiner der geprüften chemischen Eigenschaften so groß, wie bei der Korngröße. Dies läßt sich am besten an der maximalen

[1]) Siehe erste Mitteilung, diese Zeitschr. **177**, 168, 1926.

Tabelle II.

Korngröße des Weizens.

Korngewicht g	Zahl der Fälle							Verteilung, gerechnet in Prozenten der Gesamtanalysenzahl						
	1900	1901	1902	1903	1904	1905	Σ	1900	1901	1902	1903	1904	1905	Σ
16						1	1						0,1	0,03
18					2	1	3					0,3	0,1	0,08
20		1			3		4		0,3			0,4		0,1
22	2	4		1	20	3	30	0,4	1,0		0,2	2,8	0,3	0,8
24	9	15	1		31	22	78	1,8	3,9	0,1		4,3	2,2	2,0
26	18	35	2	7	63	45	170	3,7	9,1	0,3	1,4	8,7	4,6	4,4
28	43	41	6	20	72	109	291	8,7	10,7	0,8	4,1	10,0	11,1	7,6
30	71	73	37	62	89	168	500	14,4	19,0	4,8	12,8	12,3	17,2	13,1
32	91	*94*	65	115	84	*226*	675	18,5	*24,5*	8,4	23,7	11,6	*23,1*	18,0
34	*100*	63	157	*121*	85	201	*727*	*20,3*	16,9	20,3	*24,9*	11,8	20,4	*19,0*
36	69	17	*182*	76	*104*	108	556	14,0	4,4	*23,5*	15,6	*14,4*	11,0	14,5
38	51	22	161	48	80	52	414	10,4	5,7	20,8	9,9	11,1	5,3	10,8
40	23	10	76	19	53	22	203	4,7	2,6	9,8	3,9	7,3	2,2	5,3
42	8	5	55	14	20	6	108	1,6	1,3	7,1	2,9	2,8	0,6	2,8
44	6	2	20	2	9	8	47	1,2	0,5	2,6	0,4	1,2	0,8	1,2
46			5	1	7	2	15			0,6	0,2	1,0	0,2	0,4
48			4		1	2	7			0,5		0,1	0,2	0,2
50	1	2	2			2	7	0,2	0,5	0,3		—	0,2	0,2
Relative Variationsbreite.														
	2,27	2,50	2,08	2,09	2,67	3,13	3,13							

Schwankung dieser Größe demonstrieren (= maximale Variationsbreite in den Jahreskurven/minimale Variationsbreite in den Jahreskurven). Diese Zahlen sind die folgenden:

	Eiweiß	Fett	Cellulose	Asche	Körnergröße
Maximale Schwankung	1,23	1,21	1,29	1,16	1,51

Ebenso zeigen auch die Prozentzahlen der häufigsten Werte viel größere Schwankungen bei dem Körnergewicht als bei den untersuchten chemischen Eigenschaften (außer Eiweiß).

	Eiweiß	Fett	Cellulose	Asche	Körnergewicht
Maximale Schwankung (Proz.-Zahlen der häufigsten Werte)	1,88	1,27	1,23	1,28	1,73

Dabei muß jedoch bemerkt werden, daß diese große Schwankung *nur* durch zwei ausfallende Werte bestimmt ist und die vier anderen Werte gerade eine überaus große Konstanz aufweisen, wie sich dies ergibt, wenn wir die maximale Schwankung der vier höchsten Werte berechnen.

	Eiweiß	Fett	Cellulose	Asche	Körnergewicht
Maximale Schwankung (Proz.-Zahlen der häufigsten Werte)	1,18	1,09	1,11	1,18	1,08

In der Weise erhalten wir bei Körnergewicht die kleinste Schwankung, was um so bemerkenswerter ist, da die große Schwankung eben durch das Jahr 1904 hervorgerufen wird, welches auch in anderer Hinsicht anomale Verhältnisse aufweist (siehe die erste Arbeit).

Die Symmetrie der häufigsten Gruppe ist bei den einzelnen Jahreskurven im Gegensatz zur mittleren Kurve nicht nachweisbar. In vier Fällen liegt das Maximum den Minimumgrenzen näher, in einem Jahre liegt es in der Mitte und in dem auch sonst als Ausnahme geltenden Falle vom Jahre 1904 der Maximalgrenze näher, was dadurch verursacht ist, daß die Zahl der Fälle mit geringem Körnergewicht im Jahre 1904 sehr groß ist.

II. Die variationsstatistische Untersuchung des Hektolitergewichts.

Das Gesamtmaterial der 6 Jahre (3727 Fälle) ist aus Tabelle III zu ersehen:

Die Kurve (Tabelle IIIa) unterscheidet sich ganz wesentlich von allen bis jetzt beim Weizen beobachteten Verteilungstypen, da sie *zwei Maxima* aufweist. Allerdings verschwindet dieses doppelte Maximum, wenn wir nur die halbe Anzahl der Gruppen nehmen und die Einteilung Tabelle IIIb oder auch IIIc wählen, wobei das Maximum noch ausgeprägter wird.

In beiden Fällen (b und c) haben wir aber eine überaus geringe Anzahl von Gruppen (insgesamt 11), was viel kleiner ist als die geringste Gruppen-

Tabelle III.

Hektolitergewicht des Weizens (mittlere Kurven).

a)			b)			c)		
Hektoliter-gewicht (kg) (Klassen-mitten)	Zahl der Fälle	Verteilung in Proz. der Gesamtzahl	Hektoliter-gewicht (kg) (Klassen-mitten)	Zahl der Fälle	Verteilung in Proz. der Gesamtzahl	Hektoliter-gewicht (kg) (Klassen-mitten)	Zahl der Fälle	Verteilung in Proz. der Gesamtzahl
65,5	5	0,13	66	9	0,24	65	5	0,13
66,5	4	0,11						
67,5	12	0,32	68	24	0,64	67	16	0,43
68,5	12	0,32						
69,5	30	0,81	70	67	1,80	69	42	1,13
70,5	37	0,93						
71,5	87	2,33	72	157	4,21	71	124	3,33
72,5	70	1,88						
73,5	181	4,86	74	378	10,17	73	251	6,74
74,5	197	5,29						
75,5	260	6,98	76	738	19,80	75	457	12,26
76,5	*478*	*12,85*						
77,5	380	10,18	78	886	23,77	77	858	23,03
78,5	506	13,57						
79,5	*624*	*16,74*	80	*1129*	*30,31*	79	*1130*	*30,33*
80,5	405	10,86						
81,5	285	7,67	82	408	10,94	81	690	18,50
82,5	123	3,30						
83,5	26	0,70	84	30	0,81	83	149	4,00
84,5	4	0,11						
85,5	1	0,03	86	1	0,03	85	5	0,13

zahl von 14, welche beim Fett eben infolge der großen Häufigkeit der Fälle angenommen wurde. Das doppelte Maximum findet seine Erklärung darin, daß die Maxima der Einzelkurven sehr stark auseinanderfallen und auch, weil die Einzelkurven solche doppelte Maxima aufweisen.

Eine weitere auffallende Erscheinung der mittleren Kurve bildet ihre sehr starke Schiefheit. Wenn wir die zusammengezogenen Kurven (b und c) betrachten, ist dies besonders auffallend, indem der häufigste Wert eben an der Grenze des dem Maximum naheliegenden Drittel der Gruppen liegt, und bei der mehr Gruppen zählenden Einteilung (a) fällt sogar das erste Maximum der Kurve in die dem Maximalwert näherfallende Hälfte, so daß beide häufigste Werte in die *eine* Hälfte der Tabelle gruppiert sind. Die *relative Variationsbreite* beträgt 1,31, ist also die geringste unter allen bisher beim Weizen beobachteten Werten. Die *Prozentzahl der häufigsten Gruppe* beträgt 16,74, wenn wir dieselbe nach der nicht zusammengezogenen Reihe (Tabelle IIIa) berechnen, dagegen 30,3, wenn man als Grundlage der Berechnung die beiden die halbe Anzahl der Glieder enthaltende Tabellen (b und c) nimmt. Diese große Divergenz der Zahlen zeigt uns deutlich, daß die Häufigkeitstabelle des Hektolitergewichts wesentlich differiert von den bisher behandelten Werten. Dadurch kann auch der Prozentsatz der häufigsten Gruppe nicht direkt mit den anderen ähnlichen Zahlen verglichen werden. Hierauf soll aber erst an einer späteren Stelle näher eingegangen werden.

In der Tabelle IV sind die Jahrestabellen des Hektolitergewichts angegeben.

Tabelle IV.

Jahrestabellen des Hektolitergewichts des Weizens.

a)

Hektoliter-gewicht kg	Zahl der Fälle						Σ (Mittlere Kurve)	Verteilung in Prozenten der Gesamtanalysenzahl						
	1900	1901	1902	1903	1904	1905		1900	1901	1902	1903	1904	1905	Σ
65,5		1			3	1	5		0,26			0,42	0,10	0,13
66,5					3	1	4					0,42	0,10	0,11
67,5	2	2	1	1	1	5	12	0,42	0,51	0,13	0,23	0,14	0,52	0,32
68,5	1	1	1	1	1	7	12	0,21	0,26	0,13	0,23	0,14	0,72	0,32
69,5	6	4	1	1	3	15	30	1,25	1,03	0,13	0,23	0,42	1,57	0,81
70,5	3	14	1	3	2	14	37	0,63	3,61	0,13	0,70	0,28	1,45	0,93
71,5	17	17	6	3	8	36	87	3,55	4,38	0,80	0,70	1,12	3,73	2,33
72,5	14	13	4	4	7	28	70	2,92	3,35	0,53	0,93	0,98	2,90	1,88
73,5	27	45	9	17	10	75	181	5,64	11,70	1,19	3,96	1,40	7,76	4,86
74,5	25	29	27	30	18	68	197	5,22	7,48	3,58	6,99	2,52	7,04	5,29
75,5	32	66	25	41	28	68	260	6,68	17,03	3,31	9,56	3,93	7,04	6,98
76,5	*67*	*93*	56	69	60	133	*478*	*13,98*	*23,97*	7,43	16,07	8,42	13,76	*12,85*
77,5	50	44	45	61	62	118	380	10,44	11,34	5,97	14,22	8,70	12,22	10,18
78,5	55	27	99	*86*	98	141	506	11,48	6,96	13,12	*20,04*	13,57	14,59	13,57
79,5	*58*	24	*165*	61	*174*	*142*	*624*	12,21	6,19	*21,88*	14,22	*24,43*	*14,69*	*16,74*
80,5	*58*	7	129	32	109	70	405	12,21	1,80	17,12	7,46	15,28	7,25	10,86
81,5	47	1	110	15	76	36	285	9,81	0,26	14,58	3,50	10,66	3,73	7,67
82,5	15		54	2	45	7	123	3,13		7,16	0,47	6,31	0,72	3,30
83,5	2		18		5	1	26	0,42		2,39		0,70	0,10	0,70
84,5			3	1			4			0,35	0,23			0,11
85,5				1			1				0,23			0,03

Tabelle IV (Fortsetzung).

b)

Hektoliter-gewicht kg	Zahl der Fälle						Σ	Verteilung in Prozenten der Gesamtanalysenzahl						
	1900	1901	1902	1903	1904	1905		1900	1901	1902	1903	1904	1905	Σ
66		1			6	2	9		0,26			0,98	0,21	0,24
68	3	3	2	2	2	12	24	0,63	0,77	0,27	0,47	0,28	1,24	0,64
70	9	18	2	4	5	29	67	1,88	4,64	0,27	0,93	0,70	3,00	1,80
72	31	30	10	7	15	64	157	6,44	7,74	1,33	1,63	2,10	6,62	4,20
74	52	74	36	47	28	143	378	10,86	19,06	4,77	10,96	3,96	14,80	10,17
76	99	*159*	81	110	88	201	738	20,65	*40,99*	10,74	25,64	12,35	20,81	19,80
78	105	71	144	*147*	160	*259*	886	21,93	18,24	19,09	*34,26*	22,44	*26,82*	23,77
80	*116*	31	*294*	93	*283*	212	*1129*	*24,23*	7,98	*38,98*	21,68	*39,68*	21,94	*30,31*
82	62	1	164	17	121	43	408	12,94	0,26	21,75	3,96	16,97	4,45	10,94
84	2		21	1	5	1	30	0,42		2,79	0,23	0,70	0,10	0,81
86				1			1				0,23			0,03

c)

65		1			3	1	5		0,26			0,42	0,10	0,13
67	2	2	1	1	4	6	16	0,42	0,51	0,13	0,23	0,56	0,62	0,43
69	7	5	2	2	4	22	42	1,46	1,29	0,27	0,47	0,56	2,28	1,13
71	20	31	7	6	10	50	124	4,18	7,99	0,93	1,40	1,40	5,18	3,33
73	41	58	13	21	17	103	251	8,56	14,95	1,72	4,90	2,38	10,66	6,74
75	57	95	52	71	46	136	457	11,90	24,49	6,89	16,54	6,45	14,08	12,26
77	*117*	*137*	81	130	122	251	858	*24,43*	*37,23*	10,74	30,31	17,11	25,98	23,03
79	113	51	*264*	*147*	*272*	*283*	*1130*	23,60	13,14	*35,00*	*34,26*	*38,26*	*29,29*	*30,33*
81	105	8	239	47	185	106	690	21,93	2,06	31,67	10,96	25,94	10,97	18,50
83	17		72	2	50	8	149	2,19		9,54	0,47	7,00	0,83	4,00
85			3	2			5			0,35	0,47			0,13

Auch die Jahreskurven zeigen deutlich, daß das Hektolitergewicht des Weizens sich betreffend der Verteilung der Werte wesentlich anders verhält als die anderen bisher behandelten Eigenschaften. Nur die Jahreskurve von 1904 hat kein doppeltes Maximum, wenn wir die Tabellen mit anderen Gruppen zum Vergleich heranziehen, allerdings verschwinden diese zweiten Maxima alle in den zusammengezogenen Gruppen. Alle Jahreskurven zeigen eine große Schiefheit um die mittlere Kurve, indem die höheren Häufigkeitszahlen dem höchsten Werte des Hektolitergewichts bedeutend näher liegen als der unteren Grenze. In drei Fällen liegt das zweite Maximum genau in der Mitte der Kurven, in zwei Fällen aber fällt auch dieses in den die höheren Werte enthaltenden Abschnitt.

Die Variationsbreiten und die relativen Häufigkeitszahlen sind in Tabelle V angegeben.

Tabelle V.

	1900	1901	1902	1903	1904	1905	Mittlere Kurve
Relative Variationsbreite .	1,24	1,24	1,25	1,27	1,27	1,27	1,31
Proz. d. häufigsten Gruppe (Tabelle IV, a)	13,98	23,97	21,88	20,04	24,43	14,69	16,74
Proz. d. häufigsten Gruppe (Tabelle IV, b)	24,23	40,99	38,98	34,26	39,68	26,82	31,31
Proz. d. häufigsten Gruppe (Tabelle IV, c)	24,43	37,23	35,00	34,26	38,28	29,30	31,33

Die *Variationsbreite* des Hektolitergewichts in den Jahreskurven zeigt eine überaus große Konstanz, indem die maximale Abweichung nur etwa 2,5 Proz. der Variationsbreite beträgt. Eine solche Konstanz konnte bei keiner anderen Eigenschaft beobachtet werden. Dabei muß bemerkt werden, daß auch diese geringe Veränderung der Variationsbreite eine ganz konstante Zunahme ist, welche von 1900 bis 1905 ganz regelmäßig stattfindet. Hingegen ist in den Prozentzahlen der häufigsten Gruppe in dem Falle gar keine Regelmäßigkeit nachweisbar, was sicherlich eben damit im Zusammenhang steht, daß die Maxima dieser Kurven sehr schlecht definiert sind.

Bei jeder Gruppenteilung zeigen diese Zahlen eine überaus große Variabilität, welche größer ist als bei den chemischen Eigenschaften.

Wir können also in dieser Weise die beiden hier untersuchten Eigenschaften hinsichtlich der Häufigkeitskurve nicht so gut charakterisieren, wie die chemischen Eigenschaften, denn einerseits zeigen diese Werte eine größere Variabilität, andererseits liegen die Verhältnisse viel komplizierter. Auch lassen sich die berechneten Zahlen nicht so gut mit den Werten anderer Eigenschaften vergleichen. Jedenfalls kann auch in diesen Fällen *nicht die Binomialkurve* zur Zusammenfassung der Werte benutzt werden, denn insbesondere das Hektolitergewicht weist eine ganz regelmäßige, große Schiefheit der Verteilungskurve auf.

Diese Untersuchungen machen es notwendig, daß wir zunächst die Methode dahin vervollkommnen, daß die verschiedenen Eigen-

schaften durch untereinander besser vergleichbare Zahlenwerte charakterisiert werden. Dies erfordert aber eine nähere Charakterisierung der Gruppierungsmethode. Bis jetzt ist man diesbezüglich ganz willkürlich vorgegangen, indem man die Gruppenteilung so ausführte, daß man nach Möglichkeit die Unregelmäßigkeiten der Einzelkurve auszuschalten trachtete. Wie groß bei verschiedener Gruppierung die Abweichungen in derselben Kurve sein können, zeigt uns der Fall des Hektolitergewichts. In den weiteren Untersuchungen soll es unsere Aufgabe sein, die Grundlagen einer natürlichen Gruppenteilung zu bestimmen, um Häufigkeitskurven der verschiedenen Eigenschaften untereinander am zweckmäßigsten vergleichen zu können.

Ernährungslehre und Variationsstatistik.

III. Mitteilung:
Über den Cellulosegehalt der Weizenkörner.

Von

L. Berczeller und **H. Wastl.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 10. August 1926.)

Der Cellulosegehalt des Weizenkorns wurde deswegen als Ausgangspunkt dieser weiteren Untersuchungen gewählt, da eben der Cellulosegehalt eine verhältnismäßig (gegenüber den anderen chemischen Bestandteilen) einfache räumliche Verteilung im Weizenkorn aufweist, indem die Cellulose fast ausschließlich die äußerste Schicht des Kornes bildet, außerdem aber chemisch am einfachsten zusammengesetzt ist, was weder von der „Asche", noch von dem „Fette", aber auch nicht von dem „Eiweiß" des Weizenkorns auf Grund der üblichen Analysen behauptet werden kann.

Auch hat es sich bereits in der ersten Mitteilung herausgestellt, daß bei dem Cellulosegehalt die Variationskurven der verschiedenen Jahre ganz spezifische Unterschiede aufweisen, indem von 1900 bis 1905 eine stetige Vermehrung nachzuweisen ist. Die Variabilität wird insofern eine geringere, als die häufigste Gruppe immer dichter wird. Eine symmetrische, in so kurzer Zeitperiode erfolgende Veränderung einer Eigenschaft des Weizens beansprucht selbstverständlich ein erhöhtes Interesse.

In der ersten Mitteilung wurden bereits die sechs Jahreskurven des Cellulosegehalts angegeben und kurz behandelt.

Zaharia[1]) hat verschiedene Untergruppen des untersuchten Weizens (nach botanischer Einteilung und nach der Herkunft des Saatgutes) aufgestellt, wonach man die Weizensorten in einzelne Gruppen teilen kann. Bevor auf eine nähere Untersuchung der Variationskurven eingegangen

[1]) Le blé roumain, Bukarest 1910, 581 Seiten.

Tabelle I.

Cellulosegehalt der verschiedenen Weizensorten.

(Σ_m = mittlere Kurve.)

Cellulose (Klassenmitten) Proz.	Verteilung in Proz. der Analysenzahl							Zahl der Fälle						
	1900	1901	1902	1903	1904	1905	Σ_m	1900	1901	1902	1903	1904	1905	Σ_m
a) Weizen I.														
1,65	0,70						0,19	1						1
1,75	0,70						0,19	1						1
1,85	0,70		0,78				0,33	1		2				3
1,95		1,01	2,35	3,10			1,20		1	6	4			11
2,05	11,89	1,01	4,31	5,43			3,93	17	1	11	7			36
2,15	13,98	14,00	11,77	7,76			8,07	20	14	30	10			74
2,25	*19,58*	15,20	13,34	3,88			8,94	*28*	15	34	5			82
2,35	16,78	19,19	*23,91*	17,84	4,64	0,71	14,72	24	19	*61*	23	7	1	135
2,45	16,08	*21,21*	15,29	20,15	16,55	7,14	*15,70*	23	*21*	39	26	25	10	*144*
2,55	11,18	9,10	11,37	*20,93*	*21,74*	11,43	14,17	16	9	29	*27*	*33*	16	130
2,65	4,90	10,10	12,16	9,31	20,43	10,71	11,56	7	10	31	12	31	15	106
2,75	2,10	4,40	4,31	10,07	18,54	*26,42*	10,47	3	4	11	13	28	*37*	96
2,85	0,70	3,30	0,39	0,78	12,58	22,86	6,22	1	3	1	1	19	32	57
2,95	0,70	1,01			2,65	18,58	3,49	1	1			4	26	32
3,05		1,01			1,99	1,43	0,76		1		1	3	2	7
3,15						0,71	0,19						1	1
3,25					0,66		0,19					1		1
3,35														
Σ								143	99	255	129	151	140	917
elative ationsreite	1,79	1,56	1,54	1,56	1,38	1,34	1,97							
b) Weizen II.														
1,65			0,44				0,07			1				1
1,75														
1,85				0,94			0,07				1			1
1,95	0,46	0,79			0,41		0,21	1	1			1		3
2,05	6,20	3,17	4,00	2,80			2,07	13	4	9	3			29
2,15	9,26	5,56	6,22	8,42		0,21	3,64	20	7	14	9		1	51
2,25	12,50	12,70	12,88	8,42	0,82	0,62	6,15	27	16	29	9	2	3	86
2,35	18,52	17,46	16,00	8,42	6,15	1,87	9,04	40	22	36	9	15	9	131
2,45	*21,29*	*21,43*	15,11	11,12	9,43	3,14	11,28	*46*	*27*	34	12	23	15	157
2,55	13,43	15,87	*16,89*	*24,30*	18,03	4,87	14,29	29	20	*38*	*26*	44	43	200
2,65	10,64	13,48	16,44	14,96	20,07	15,38	*15,44*	23	17	37	16	49	74	*216*
2,75	3,70	4,76	5,34	10,28	*24,17*	*23,91*	15,07	8	6	12	11	*59*	*115*	211
2,85	1,85	2,38	4,88	8,42	12,29	21,21	11,36	4	3	11	9	30	102	159
2,95	0,46	1,59	0,44	0,94	7,38	11,86	6,57	1	2	1	1	18	69	92
3,05	0,46	0,79	0,44	0,94	1,23	6,03	2,57	1	1	1	1	3	29	36
3,15	1,39					3,74	1,57	3		1			18	22
3,25						0,62	0,21						3	3
3,35							0,07							1
Σ								216	126	225	107	244	481	1399
ative ationsite	1,62	1,56	2,03	1,65	1,56	1,51	2,03							

Tabelle I (Fortsetzung).

Cellulosegehalt der verschiedenen Weizensorten.

(Σ_m = mittlere Kurve.)

Cellulose (Klassenmitten) Proz.	Verteilung in Proz. der Analysenzahl							Zahl der Fälle					
	1900	1901	1902	1903	1904	1905	Σ_m	1900	1901	1902	1903	1904	1905
c) Weizen III.													
1,65													
1,75													
1,85					0,59		0,13					1	
1,95			1,26				0,26			2			
2,05	8,34		2,52	3,52	1,17		1,92	4		4	5	2	
2,15	2,08	4,35	6,29	0,70	1,76		2,43	1	4	10	1	3	
2,25	14,58	8,70	11,94	6,34	2,34	0,59	6,14	7	8	19	9	4	1
2,35	10,42	15,22	*20,13*	7,75	6,44	0,59	9,46	5	14	*32*	11	11	1
2,45	*27,08*	21,75	18,24	11,98	16,38	6,48	15,08	*13*	20	29	17	28	11
2,55	12,50	*23,91*	9,40	*21,84*	16,38	9,41	15,08	6	*22*	15	*31*	28	16
2,65	12,50	14,13	18,24	14,50	*21,05*	18,23	*17,35*	6	13	*29*	22	*36*	31
2,75	6,25	6,52	7,56	16,90	15,79	18,23	13,18	3	6	12	24	27	31
2,85	6,25	4,35	1,89	10,56	14,62	*21,76*	11,13	3	4	3	15	25	*37*
2,95		1,08	1,89	0,70	1,17	14,22	3,96		1	3	1	2	24
3,05			0,63	4,20	1,17	8,23	2,94			1	6	2	14
3,15					1,17	2,35	0,48					2	4
3,25													
3,35													
Σ								48	92	159	142	171	170
Relative Variationsbreite	1,39	1,37	1,56	1,49	1,70	1,40	1,70						
d) Weizen IV.													
1,65													
1,75													
1,85													
1,95	1,92		1,77				0,34	1		1			
2,05	9,61		5,31	1,79		0,63	1,88	5		3	2		1
2,15	5,73	1,96	15,93	6,25	0,79	0,63	3,77	3	1	9	7	1	1
2,25	5,73	5,88	3,54	10,72	0,79	0,63	3,77	3	3	2	12	1	1
2,35	*19,23*	9,80	*20,00*	13,39	5,55	3,16	10,10	*10*	5	*17*	15	7	5
2,45	11,54	21,57	18,82	13,39	10,31	2,53	11,22	6	11	16	15	13	4
2,55	17,31	*27,47*	12,94	*18,75*	15,07	5,70	14,21	9	*14*	11	*21*	19	9
2,65	11,54	7,84	14,12	17,90	23,02	16,46	16,70	6	4	12	20	29	26
2,75	13,46	15,68	12,39	10,72	*26,99*	20,29	*17,13*	7	8	7	12	*34*	32
2,85	1,92	3,92	5,31	6,25	12,70	*25,32*	10,08	1	2	3	7	16	*40*
2,95	1,92	3,92	3,54	0,89	2,37	17,72	6,68	1	2	2	1	3	28
3,05		1,96			2,37	2,53	1,37		1			3	4
3,15			1,77			1,89	0,69			1			3
3,25			1,77			2,53	0,86			1			4
3,35													
Σ								52	51	85	112	126	158
Relative Variationsbreite	1,51	1,42	1,67	1,44	1,42	1,59	1,67						

werden soll, scheint es zweckmäßig, nach dieser Gruppenteilung das Material zu ordnen[1]).

Zaharia unterscheidet bei allen seinen Analysen 19 Gruppen von Weizen. Diese sind die folgenden:

1. Weißer Banater Winterweizen,
2. Einheimischer Winterweizen,
3. Roter Winterweizen,
4. Weißer Winterweizen,
4a. Alter weißer Winterweizen,
5. Arnauten-Weizen
6. Oulca-Weizen,
7. Ghirca-Weizen,
8. Gemischter Weizen,
9. Gestreifter Weizen,
10. Theiss-Weizen,
11. Weißer Sommerweizen,
12. Glasiger Weizen,
13. Amerikanischer Grannenweizen,
14. Einheimischer Weizen aus französischem Saatgut,
15. Riesenkornweizen,
16. Bulgarischer Weizen,
17. Polnischer Weizen,
18. Türkischer Weizen,
19. Mandschurischer Weizen.

Praktisch kommen aber die meisten Analysen den Gruppen 1 bis 4 zu, wobei den Weizensorten 1 und 2 die meisten Analysenzahlen zufallen. In Tabelle I a bis d sind die Jahresgruppen angegeben, wobei die einzelnen Weizenarten separierte Gruppen bilden.

Aus Tabelle I ersehen wir sofort

1. daß die von *Zaharia* unterschiedenen verschiedenen Weizensorten auch charakteristische Unterschiede in ihrem Cellulosegehalt aufweisen,

2. daß die in den verschiedenen Jahrgängen beobachteten Differenzen sich regelmäßig bei den Weizensorten wiederholen.

Ein ganz grobes Vergleichen der Verteilungskurven zeigt uns schon das differente Verhalten der vier Weizensorten an.

Weizensorte:	I	II	III	IV
Mittleres Maximum der Fälle (Maximum der mittleren Kurve)	2,45 Proz.	2,65 Proz.	2,65 Proz.	2,75 Proz.

Wie aus den vorausgehenden Zahlen ersichtlich, zeigt Weizen I den kleinsten Prozentsatz an Cellulose in der häufigsten Gruppe, II und III bei derselben um 8 Proz. höheren Gehalt. Bei Weizen IV ist der Cellulosegehalt des dichtesten Wertes sogar um 12 Proz. höher als Weizen I. Interessant ist in der Beziehung, daß Weizen I aus importiertem Weizen (Banat, Ungarn) stammt, die drei anderen Sorten dagegen aus einheimischem (rumänischem) Weizen.

Derselbe Unterschied ist auch in den einzelnen Jahreskurven nachweisbar, besonders was den Unterschied zwischen Weizen I gegenüber den anderen Weizensorten betrifft.

[1]) Jede Unterteilung verursacht selbstverständlich, da die Anzahl der Fälle in einer Gruppe sehr vermindert wird, eine große Abnahme der Sicherheit in den Gesetzmäßigkeiten, so daß die beiden entgegengesetzt wirksamen Faktoren in einem Mittel ausgeglichen werden müssen.

Tabelle II.

1900	I < IV < II = III
1901	I = II < III = IV
1902	I = III = IV < II
1903	I = II = III = IV
1904	I < III < II = IV
1905	I = II < III = IV

In Tabelle II ist die Reihenfolge der häufigsten Werte der einzelnen Weizensorten in den Jahren 1900 bis 1905 angeführt. Dabei stellt sich heraus, daß Weizen I regelmäßig den geringsten Prozentgehalt an Cellulose im häufigsten Werte aufweist.

Tabelle III.

Weizen:	I	II	III	IV
1900	2,25	2,45	2,45	2,35
1901	2,45	2,45	2,55	2,55
1902	2,35	2,55	2,35	2,35
1903	2,55	2,55	2,55	2,55
1904	2,55	2,75	2,65	2,75
1905	2,75	2,75	2,85	2,85
Σ_m	2,45	2,65	2,65	2,75

In Tabelle III ist der Gang der häufigsten Gruppe bei den einzelnen Weizensorten nach Jahrgängen angegeben.

Wie aus Tabelle III ersichtlich, zeigen die Maxima der Jahreskurven der einzelnen Weizensorten eine ausgesprochene Zunahme der Werte von 1900 bis 1905. Nur im Jahre 1902 ist in drei Fällen (Weizen I, III, IV) ein Zurückfallen des häufigsten Wertes zu beobachten, welches aber bereits im Jahre 1903 kompensiert wird. Besonders groß ist diese Zunahme in den Jahren 1904 und 1905. Jedoch ist aus Tabelle III zu entnehmen, daß dies nur einen auffallenderen Zuwachs des schon in den vorigen Jahren stattfindenden Vorganges bedeutet. Da eine systematische Veränderung des Weizens binnen 6 Jahren doch eine höchst auffallende Erscheinung ist, soll sie einer näheren Untersuchung unterzogen werden, um so mehr, als auch ein ähnlicher Gang der Grenzwerte (insbesondere Minima) beobachtet werden kann.

Dasselbe Verhalten zeigen die verschiedenen Weizensorten auch betreffs der Zentral-(Median-)Werte.

Tabelle IV.

Zentrale (Median-)Werte der Jahreskurven.

	1900	1901	1902	1903	1904	1905	Σ
I	2,35	2,35	2,35	2,45	2,65	2,75	2,45
II	2,45	2,45	2,45	2,55	2,65	2,75	2,65
III	2,45	2,50	2,45	2,55	2,65	2,75	2,60
IV	2,45	2,55	2,45	2,55	2,65	2,80	2,65
Σ	2,35	2,45	2,45	2,55	2,65	2,75	2,55

Tabelle V.

Reihenordnung der Zentralwerte.

1900	I < II = III = IV
1901	I < II < III < IV
1902	I < II = III = IV
1903	I < II = III = IV
1904	I = II = III = IV
1905	I = II = III < IV

In Tabelle IV sind die mittleren (Zentral-, Median-) Werte sowohl der einzelnen Weizensorten wie die mittleren Werte für das gesamte untersuchte Material in Jahreshäufigkeitskurven angegeben. Es zeigt sich: 1. daß der Zentralwert der mittleren Verteilungskurve bei Weizen I ebenfalls am niedrigsten im Vergleich mit den übrigen Weizensorten ist. 2. Auch in den einzelnen Jahresverteilungskurven ist dasselbe Verhalten zu beobachten, wobei nur im Jahre 1904 und 1905 Weizen I = Weizen II wird. Die zentralen Werte zeigen dieselbe regelmäßige Zunahme des Cellulosegehalts wie die häufigsten Werte. Bei den Zentralwerten ist jedoch diese Veränderung viel regelmäßiger als bei dem häufigsten Werte, da nur das Jahr 1902 diesbezüglich eine Ausnahme bildet, indem bei Weizen III und IV die Cellulosewerte niedriger sind als im Jahre 1901. Jedoch zeigen alle anderen Werte von dem Jahre 1900 bis 1905 eine regelmäßige Zunahme des Cellulosegehalts des Weizenmittelfalles.

Damit ist also nachgewiesen, daß sowohl die einzelnen Weizensorten ganz charakteristische Unterschiede in der Verteilung der Werte des Cellulosegehalts aufweisen, als auch, daß sogar in einer so kurzen Periode, wie es 6 Jahre sind, wesentliche Veränderungen, welche sich als systematische herausstellen, nachzuweisen sind. Es soll deswegen zunächst diese Untersuchung auch auf die anderen Eigenschaften des Weizens ausgedehnt werden; es ist ja auch von großer praktischer Bedeutung für die Landwirtschaft, diese Erscheinungen kennenzulernen, welche einerseits geeignet sind, als Grundlage für eine Auswahl bestimmter Samensorten zu dienen, wie auch bis jetzt nicht beachtete Veränderungen in der Zusammensetzung des Weizens aufzudecken.

Über Aktivierung von Insulin.

Von

Erhard Glaser und **Georg Halpern.**

(Aus dem chemischen Laboratorium des pharmakognostischen Universitätsinstituts in Wien.)

(Eingegangen am 10. August 1926.)

Schon *Collip* (1) wurde durch den Umstand, daß bei einem Insulinpräparat die Wirkung erst in 1 bis 4 Tagen nach der Injektion auftrat, veranlaßt, anzunehmen, daß das Insulin nicht als solches in den *Langerhans*schen Inseln vorhanden ist, sondern als Muttersubstanz, welche erst durch die Art der Extraktionsverfahren aktiviert wird. *Collip* hat scheinbar zwei nicht zusammengehörige Prozesse miteinander verbunden, doch ist zweifellos aus seinen Ausführungen der Schluß berechtigt, daß das Insulin erst durch Behandlung mit anderen Stoffen wirksam wird.

Wiechowski erwähnt in einem Vortrag in der Wiener Gesellschaft für interne Medizin, 1924, daß er wiederholt bemerken konnte, daß das Insulin beim Lagern stärker würde, und daß sich bei der Darstellung des Insulins vielleicht mehr Einheiten herausholen lassen als man bis dahin annahm. *Laufberger* (2) behauptet demgegenüber, daß alle Insulinpräparate unstabil sind und mindestens stets auf ein Zehntel ihrer Anfangsstärke absinken können. Diese scheinbar gegenteiligen Ansichten können allerdings in Einklang gebracht werden, wenn man annimmt, daß im ersten Falle aktivierende Substanzen zugegen sind, im zweiten Falle dagegen Stoffe, die das Insulin in ihrer Wirksamkeit abschwächen können. Daß die Aktivierung erst beim Lagern des Drüsenpräparats eintritt, liegt nach *Willstätter* (3) hauptsächlich daran, daß zunächst die genuinen Proteine hemmen. Bezüglich des Insulins ist schon festgestellt, daß Vorhandensein von Trypsin und Mineralsäuren, welche beide ja leicht bei nicht entsprechender Zubereitung in das Insulin übergehen, die Wirksamkeit des Insulins zerstören können. Im übrigen ist allgemein bekannt, daß Fermente durch unzweckmäßiges Reinigen geschädigt werden können.

Alle diese Beobachtungen machen es wahrscheinlich, daß im Pankreas das Hormon vielleicht zum geringen Teile als solches, zum größeren als Muttersubstanz vorhanden ist bzw., da es sich beim Insulin um ein Ferment handelt, welcher Meinung *E. Glaser* (4) bereits im Jahre 1923 Ausdruck gegeben hat, dasselbe als sogenanntes Proferment einer Aktivierung bedarf. Seit dieser Zeit wiesen *Collazo*, *Händel* und

Rubino (5) ebenfalls auf den Fermentcharakter des Insulins hin, indem sie es aus ihren Untersuchungen abzuleiten versuchten.

Im Zusammenhang damit soll hier noch auf die Feststellungen von *Kühne* (6) und *Heidenhain* (7) hingewiesen werden, denen zufolge ganz frisches Pankreas ein ganz unwirksames Extrakt liefert, während beim Altern der Drüsensubstanz regelmäßig ein wirksames Extrakt gewonnen werden konnte. Dies kann als sogenannte Spontanaktivierung und als Anerkennung der Existenz eines Protrypsins lange vor der Kinase, deren Kenntnis uns erst durch *Pawlow* und *Schepowalnikow* (8) vermittelt wurde, aufgefaßt werden und darf vielleicht als Fingerzeig für die beim Insulin bestehenden Verhältnisse dienen.

Unsere Bestrebungen waren daher dahin gerichtet, zu untersuchen, ob einigen beim Insulin in Betracht kommenden Faktoren die Fähigkeit zugeschrieben werden kann, dieses aus einer unwirksamen Form in ein wirksames Enzym überzuführen, wobei aber nicht auf alle Möglichkeiten in dieser Hinsicht eingegangen werden soll. Die Untersuchungen waren auch deshalb von Wert, weil sie im Anschluß an die Untersuchungen von *Glaser* und *Halpern* (9) Beiträge zum Zusammenhang zwischen Chemismus und Wirksamkeit zutage fördern müssen und dadurch das Insulin näher charakterisiert werden könnte. Gleichviel ob man das aktivierende Prinzip als Aktivatoren oder Cofermente bezeichnet, erschien es notwendig, diesen Stoffen nachzugehen, da sie bei der Wirksamkeit der Fermente eine Rolle spielen. Als solche Prinzipe kommen beim Insulin solche Stoffe in Betracht, die entweder schon bei der Darstellungsweise des Insulins gleichsam als zufällige Begleiter mit demselben ausgefällt werden, oder solche, mit denen das Insulin am Verbrauchsort oder auf dem Wege dahin durch die Blut- oder Lymphbahn in Berührung kommt. Wenn sich solche Stoffe feststellen lassen, so sollte natürlich allenfalls auf leichter zugängliche Ersatzstoffe Ausschau gehalten werden.

Der Kenntnis in dieser Hinsicht konnte man auch in der Weise näher kommen, daß folgende Methode eingeschlagen wurde.

Die verschieden stark wirksamen Insulinpräparate, die bereitwilligst von den Firmen Phiag, Sanabo und Chemosan zur Verfügung gestellt wurden und wofür ihnen an dieser Stelle bestens gedankt werden soll, wurden mit der aktivierenden Substanz versetzt und bei verschiedenen Reaktionen durch 24 Stunden bei Zimmertemperatur einwirken gelassen. Das Präparat wurde nachher einem Kaninchen subkutan injiziert und der Blutzucker vor und nach 3 bis 4 Stunden nach der Injektion mit der modifizierten *Bang*schen Methode bestimmt, indem statt, wie *Bang* vorschreibt, das Blut zu wägen, es mit einer Mikropipette aufgesogen und das Blut mit der Extraktionsflüssigkeit quantitativ ausgespült wurde. Als Kontrollversuch wurde immer dieselbe Menge Insulin ohne Aktivator demselben Kaninchen, um die

individuellen Unterschiede auszuschalten, einige Tage vorher injiziert und aus dem Unterschied mit und ohne Aktivator auf die Wirksamkeit desselben geschlossen. Die Tiere waren immer vor der Injektion durch 24 Stunden nüchtern.

Die Mengenverhältnisse des Insulins werden in den einzelnen Versuchen angegeben, dagegen wurde auf die Menge des Aktivators nicht Rücksicht genommen, da es sich hierbei um einen katalytischen Vorgang handelt und die kleinsten Dosen wirksam sein mußten.

Als erste Reihe von Stoffen, die als Aktivatoren in Betracht kommen konnten, waren die von *Glaser* und *Wittner* (10) im Insulin nachgewiesenen Fermente, und zwar Oxydasen und darunter die Aldehydase, ferner Peroxydasen in den Kreis der Untersuchungen gezogen worden. Übrigens konnte schon *Podolinski* (11) konstatieren, daß Protrypsin durch Liegenlassen an der Luft in das aktive Ferment übergeht, und hat dabei eine Wirkung des Sauerstoffs angenommen.

Versuch mit pflanzlicher Peroxydase.

Da aus Meerrettich verhältnismäßig einfach eine Peroxydase nach *E. v. Stöcklin* (12) zu erhalten ist, so wurde eine solche nach dieser Methode hergestellt. Sie war im trockenen Zustande gelblichweiß gefärbt und gab eine starke Purpurogallin- und Benzidineisessigreaktion. Für den Versuch wurde ein Insulin Phiag verwendet, von welchen 60 mg den Blutzucker eines 1,8 kg schweren Kaninchens von 0,176 Proz. vor der Injektion auf 0,09 Proz. nach der Injektion herabsetzen konnten. Die Lösung des Insulins reagierte stark sauer. Nach 24stündiger Einwirkung der Peroxydase auf das Insulin war die Wirkung desselben unverändert, was aus den Ziffern 0,17 Proz. vor und 0,1 Proz. nach der Injektion hervorgeht. Auch ein Zusatz von 1 ccm einer 1proz. H_2O_2-Lösung konnte die Wirksamkeit des Insulins nicht erhöhen (0,15 Proz. vor der Injektion, 0,09 Proz. nach der Injektion). Auch Wasserstoffsuperoxyd allein ohne Peroxydase änderte nach 24stündiger Einwirkung nicht die Wirksamkeit desselben. Von pflanzlichen Peroxydasen hat sich speziell die von Meerrettich als Aktivator für Insulin als unwirksam erwiesen.

Versuch mit tierischer Peroxydase.

Da sich die tierischen Peroxydasen von den pflanzlichen in ihrer Wirkung unterscheiden, so wurde auch ein Versuch mit einer solchen angeschlossen, wozu die der eosinophilen Granulasubstanz des Blutes benutzt wurde. Die von *A. Neumann* (13) nach seinen Verfahren hergestellten eosinophilen Granula, welche aus Fibrin durch Fällung mit Natronlauge und Kochen gewonnen wurden und die Benzidineisessigreaktion gaben, erwiesen sich ebenfalls als Aktivator unwirksam. Dieselbe Peroxydase ohne Insulin in großen Mengen, entsprechend etwa 20 Liter Blut, einem Kaninchen injiziert, zeigte keine blutzuckererniedrigende Wirkung, da die Ziffern 0.15 Proz. vor und 0,14 Proz. nach der Injektion wohl keine Abnahme bedeuten können. Dieser Befund ist eigentlich nicht auffällig, da die aktivierende Substanz, wie es ja beim Insulin bekannt ist, durch die scharfe Darstellungsweise zerstört worden sein konnte.

Versuche mit tierischer Oxydase.

Da demnach die von uns untersuchten pflanzlichen und tierischen Peroxydasen die blutzuckererniedrigende Substanz im Insulin nicht zu steigern vermochten, so wurden auch tierische Oxydasen für die Aktivierung herangezogen, und zwar wiederum die nach *A. Neumann* (14) aus Knochenmark hergestellte eosinophile Granulasubstanz. Die Substanz hatte eine gelbliche Farbe, gab die für Oxydasen charakteristische Naphtholparaphenylendiaminreaktion, wurde durch nicht eingreifende Verfahren (in der Kälte) gewonnen und war nur in saurem Alkohol und auch hier nicht vollständig löslich.

Die Substanz wurde in wenig salzsaurem Alkohol aufgeschwemmt, in diesem Zustand einer neutralen Lösung von 9 mg Insulin in Wasser zugefügt und durch 24 Stunden einwirken gelassen. Der Blutzucker war vor der Injektion 0,14 Proz., nach der Injektion 0,055 Proz. Als Kontrollversuch wurde dieselbe Menge Insulin mit 1 ccm n/10 HCl verwendet. Die HCl-Konzentration war in beiden Fällen dieselbe, etwa n/150 HCl. Der Blutzucker war vor der Injektion 0,16 Proz., nach der Injektion 0,1 Proz. Aus dem Wirkungsunterschied geht hervor, daß die Oxydase eine starke aktivierende Kraft auf das Insulin auszuüben vermag.

Als zweiter Versuch wurde das gleiche Insulin mit derselben Oxydase versetzt, ohne sie vorher im sauren Alkohol zu behandeln. Die Blutzuckerabnahme war von 0,15 Proz. vor auf 0,1 Proz. nach der Injektion erfolgt, was keiner Wirkung entspricht, da der blinde Versuch dasselbe Resultat ergab. Wie daraus zu ersehen ist, wirkt die Oxydase in neutraler Lösung auf das Insulin nicht ein.

Versuche mit pflanzlicher Oxydase.

Zu diesem Versuch wurde Tyrosinase gewählt, welche einem System Peroxydase—Hydroperoxyd—Coferment entspricht. Zur Darstellung wurde ein Pilz, und zwar Lactarius vellereus verwendet, der in verhältnismäßig leichter Weise eine von anderen Fermenten freie Lösung der Tyrosinase liefert. In Anlehnung an die Methode von *Cotte* (15) wurde folgendermaßen verfahren: 2 kg frisch gesammelter Pilze wurden in einer Hackmaschine fein zerkleinert und sofort gepreßt und die Lösung durch Zentrifugieren weiter enttrübt. Die nicht ganz klare Lösung von gelblichweißer Farbe wurde mit 96proz. Alkohol versetzt und der entstandene Niederschlag nach einigen Stunden durch Zentrifugieren von der Lösung getrennt. Der noch feuchte Niederschlag wurde mit Wasser versetzt und durch 2 Tage unter Toluol digeriert. Die Lösung wurde nachher nochmals zentrifugiert und das mit Wasser versetzte Zentrifugat wieder mit Alkohol gefällt und nach einem Tag Stehen abermals zentrifugiert. Der Niederschlag wurde getrocknet und eine Woche stehengelassen, da durch diese Behandlung die Lakkase größtenteils zerstört wird. Der Niederschlag wurde sodann in Wasser gelöst und zur Verwendung nochmals mit Alkohol gefällt. Die Lösung gab mit 5 Proz. Kresollösung die typische Gelbfärbung nach einigen Stunden Stehen. Bei einer p_H-Konzentration von 7,5 wurden 2 ccm der Tyrosinaselösung mit einer Lösung Insulin-Chemosan, welche im blinden Versuch eine Abnahme des Blutzuckers von 0,15 Proz. vor der Injektion auf 0,09 Proz. nach der Injektion bewirkte, versetzt. Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde injiziert. Eine Verstärkung der Wirkung konnte nicht beobachtet werden. Pflanzliche Oxydasen wirken also ebenso wie pflanzliche Peroxydasen auf das Insulin nicht ein.

Versuch mit Aldehydase.

Die dazu nötige Aldehydase wurde aus frischer Katzenleber nach dem Vorgang von *Abderhalden* (16) dargestellt, und zwar in der Weise, daß dieselbe fein zerkleinert, mit Sand verrieben und durch 24 Stunden unter Toluol in destilliertem Wasser stehengelassen wurde. Nach Kolieren und Filtrieren wurde das klare Filtrat bis zur 25proz. Sättigung mit Ammonsulfat versetzt, wobei etwas verdünnte Sodalösung zugesetzt wurde. Das Filtrat von dem durch 24stündiges Stehen entstandenen Niederschlag wurde mit Ammonsulfat bis zur 33proz. Sättigung versetzt. Nach 24 Stunden wurde wiederum filtriert und das Filtrat auf 60proz. Sättigung mit Ammonsulfat gebracht. Der Niederschlag, der sich nach 24 Stunden absetzte und welcher die Aldehydase enthält, wurde nun in Wasser aufgenommen, worin er sich zur Gänze gelöst hat. Das klare Filtrat wurde nun mit 96proz. Alkohol bis auf 30proz. Konzentration gebracht, und der dabei entstandene Niederschlag wurde sofort abfiltriert und in Wasser aufgenommen. Die wässerige Flüssigkeit wurde nun im Vakuum bei Zimmertemperatur auf wenige Kubikzentimeter eingeengt, wiederum mit Alkohol gefällt und der Niederschlag so wie das erstemal sofort in wenig Wasser gelöst. Die Flüssigkeit war vollkommen klar und verwandelte in wenigen Minuten Salicylaldehyd zu Salicylsäure.

Für den Versuch mit Aldehydase wurde wieder dasselbe Insulin wie für die Peroxydaseversuche benutzt, doch wurde es bei schwach alkalischer Lösung bei p_H 7,5, die mit verdünnter Sodalösung hergestellt wurde, mit der Aldehydase versetzt, weil dieselbe bei ganz schwach alkalischer Reaktion ihr Wirkungsoptimum hat. Nach 24stündigem Einwirken fand eine Abnahme von 0,16 auf 0,1 Proz. statt. Der blinde Versuch, der bei derselben Ionenkonzentration gemacht wurde, ergab auch eine Abnahme von 0,165 auf 0,11 Proz. Daraus ist zu ersehen, daß die Aldehydase auf das Insulin keinen Einfluß ausübt.

Versuche mit Enterokinase und Bestimmung des Wirkungsoptimums derselben auf das Insulin.

Wie bereits erwähnt, gingen wir von der Ansicht aus, daß als Aktivatoren nur Substanzen in Betracht kommen können, mit denen das Insulin von vornherein ausgestattet ist, oder mit denen es am Orte seiner eventuellen Wirksamkeit oder auf dem Wege dahin zusammenkommt. Es wurde daher ein Versuch unternommen, mit einem bekannten, im Körper bzw. im Darm vorkommenden Aktivator, nämlich der Enterokinase, die speziell bei der Verdauung, und zwar bei den aus dem Pankreas stammenden Fermenten eine Rolle spielt. Hierzu kommt noch, daß nach *John R. Murlin, C. Clyde Sutter, A. S. Allen* und *H. A. Piper* (17) Insulin in Kapseln, welche mit einer magenverdauungswiderstandsfähigen Hülle umgeben sind, unter Zusatz von 0,1 bis 0,2 Proz. HCl per os gegeben, eine günstige Wirkung auf den Blutzucker von Diabetikern ausübte. Es war daraus zu schließen, daß im Darm Substanzen vorhanden sind, welche auf das Insulin eine aktivierende Wirkung ausüben konnten.

Zu diesem Zwecke wurden ganz frische Katzendünndarme von Tieren verwendet, welche 12 Stunden vorher mit rohem Fleisch gefüttert wurden. Die Tiere wurden durch Durchschneiden der Carotiden getötet. Der Dünndarm wurde herausgenommen, die Dünndarmschleimhaut abgeschabt und

das Abgeschabte zur Extraktion in 2prom. Natriumcarbonatlösung gegeben. Nach 10 Stunden Stehen wurde koliert und filtriert, wobei kein vollkommen klares Filtrat erzielt werden konnte. Die Flüssigkeit wurde sodann mit verdünnter Essigsäure bis zur neutralen Reaktion versetzt und nach einigen Stunden Stehens filtriert. Der Niederschlag wurde nochmals in 0,5proz. Sodalösung gelöst und wiederum mit ganz verdünnter Essigsäure gefällt. Er wurde nachher durch Zentrifugieren von der Lösung getrennt und stellte so in feuchtem Zustande ein ganz weißes Pulver dar, welches sich leicht in 0,5proz. Sodalösung auflöste. Das trockene Präparat dagegen war gelblich gefärbt, und es hatte seine Löslichkeit sehr stark abgenommen. Es steht dies im Einklang mit vielen Körpersubstanzen, welche mit der Zeit, wenn sie im trockenen Zustande aufbewahrt werden, ihre vorher große Löslichkeit fast ganz einbüßen.

Die Enterokinase gab mit Benzidineisessig eine positive Reaktion, dagegen waren α-Naphthol-Paraphenylendiamin, Purpurogallin und Guajakreaktion negativ. Die Auswertung wurde nach der Methode von *E. Waldschmidt-Leitz* (18) ausgeführt. Bei p_H 8,7 wurden 5 ccm einer 3proz. Gelatinelösung mit 0,2 g Pankreatin versetzt und 30 Minuten auf 30° erhitzt und dann mit 90proz. 0,2 n alkoholischer KOH mit Thymolphthalein als Indikator titriert. Verbraucht wurden ohne Kinasezusatz 0,61 ccm der 0,2 n alkoholischen KOH und mit der durch 0,5 ccm einer 5proz. Kinaselösung zersetzten Pankreatin 0,76 ccm. Die Differenz beträgt also 0,15 ccm 0,2 n KOH. Der Wirkungswert war also $^1/_6$ K.-E. (Kinaseeinheiten).

Für die ersten Versuche mit Kinase wurde das amerikanische Insulin Lilly verwendet. 0,3 ccm dieses Insulins auf schwach alkalische Reaktion (p_H 8,4) gebracht und mit etwas Kinase versetzt, zeigt eine Blutzuckerherabsetzung von 0,14 Proz. bei einem 3 kg schweren Kaninchen auf 0,06 Proz. nach der Injektion. Das gleiche Insulin im blinden Versuch zeigte bloß eine Herabsetzung von 0,15 auf 0,1 Proz. Der zweite Versuch wurde ebenfalls mit Insulin Lilly vorgenommen, welches aber durch ziemlich langes Stehen ohne hermetischen Verschluß fast vollständig unwirksam geworden war. Und zwar vermochten 0,35 ccm des Insulins bei einem 1,7 kg schweren Kaninchen den Blutzucker bloß von 0,18 auf 0,15 Proz. herabzusetzen. Durch Aktivierung des Insulins mit Kinase in alkalischer Reaktion bei p_H 7,8 konnte bei demselben Tiere eine Abnahme des Blutzuckers bei nur 0,2 ccm des Insulins von 0,16 auf 0,06 Proz. nach der Injektion beobachtet werden. Man sieht also, daß ein durch langes Stehen in seiner Wirksamkeit abgeschwächtes Insulin durch Kinase wieder reaktiviert werden kann. Der nächste Versuch, der mit Kinase gemacht wurde, war wieder mit demselben Insulin wie bei der Peroxydase, und zwar bei alkalischer Reaktion gemacht worden. Bei 60 mg Insulinmenge war die Abnahme von 0,14 auf 0,06 Proz. (p_H 8,0), wogegen der blinde Versuch, wie bereits erwähnt, bloß eine Abnahme auf 0,1 Proz. bewirken konnte. Bei dem nächsten Versuch, der mit demselben Insulin gemacht wurde, war die Wirkung noch stärker, und zwar bekam das Tier nach 3½ Stunden starke hypoglykämische Krämpfe, so daß keine Blutzuckerbestimmung gemacht werden konnte. Da aber an dem Tier später festgestellt wurde, daß die Krämpfe bei 0,05 Proz. Blutzucker auftreten, so muß der Blutzuckergehalt in diesem Falle unter dieser Zahl gewesen sein. Der Versuch wurde bei p_H 7,5 ausgeführt. Es wurden auch Versuche mit einem Insulin, welches nur in n/100 HCl löslich war, vorgenommen. 40 mg dieses Insulins mit einem fein suspendierten Niederschlag der Kinase versetzt (durch Lösen derselben in

Alkali und Fällen) und 24 Stunden unter öfterem Schütteln stehengelassen, zeigte keine stärkere Wirkung als im blinden Versuch. Man kann daraus ersehen, daß die Kinase in saurer Lösung nicht wirkt, was ja auch aus ihrer Unlöslichkeit in Säuren hervorgeht. Weitere Versuche wurden mit Insulin Chemosan gemacht. Injiziert wurden 10 mg, wobei mit Sodalösung die p_H auf 7,3 gebracht wurde. Der Blutzucker betrug vor der Injektion 0,16, nach der Injektion 0,09 Proz. Dieselbe Menge des Insulins mit Kinase versetzt, verursachte bei derselben p_H eine Blutzuckerabnahme von 0,14 Proz. vor, auf 0,04 Proz. nach der Injektion. Der nächste Versuch wurde bei p_H 6 gemacht. Auch hier war der Versuch in saurer Lösung negativ. Um festzustellen, ob eine stark saure Reaktion von Einfluß auf die Aktivierung dieses Insulins ist, wurde ein Versuch bei p_H 4,5 (durch einen Essigsäureacetatpuffer hergestellt) gemacht. Ein blinder Versuch war hier nicht notwendig, da, wie später festgestellt, die Wirkung des Insulins in saurer und alkalischer Reaktion die gleiche ist. Auch dieser Versuch im sauren Milieu war negativ; die Werte waren 0,15 Proz. vor und 0,09 Proz. nach der Injektion. Im stärker alkalischen Milieu bei p_H 9,1 ist die Wirkung bereits sehr gering, die Abnahme bewegte sich von 0,15 Proz. vor der Injektion auf 0,08 Proz. nach derselben.

Tabelle I.

p_H	Blinder Versuch unabhängig von p_H		Insulin	Menge	Mit Kinase	
	vor Injektion	nach Injektion			vor Injektion	nach Injektion
	Blutzucker in Proz.				Blutzucker in Proz.	
9,1	0,16	0,09	Chemosan	10 mg	0,15	0,08
8,4	0,15	0,1	Lilly	0,3 ccm	0,14	0,06
8,0	0,15	0,1	Phiag	60 mg	0,14	0,06
7,8	0,18	0,15	Lilly (alt)	0,2 ccm	0,16	0,06
7,5	0,15	0,1	Phiag	60 mg	0,15	0,05 Krämpfe
7,3	0,16	0,09	Chemosan	10 „	0,14	0,04
6,0	0,16	0,09	„	10 „	0,15	0,095
4,5	0,16	0,09	„	10 „	0,15	0,09
n/100 HCl	0,14	0,08	Phiag	40 „	0,14	0,075

Aus der Tabelle I ist zu ersehen, daß das Optimum der Einwirkung der Kinase auf das Insulin zwischen p_H 7,8 und 7,3 liegt.

Es wurde nun noch nachzusehen versucht, ob in wirksamen Insulinpräparaten Kinase nach dem Vorgang von *Waldschmidt-Leitz* abzutrennen möglich ist. Nach demselben wurde der Komplex Enzym—Coenzym (Insulin—Kinase) in eigensaurer Lösung mit Tonerde als Adsorbens behandelt. Weder das alkalische Eluat aus der Tonerde noch die mit Tonerde behandelte Flüssigkeit zeigt eine blutzuckerherabsetzende Wirkung. Die beiden Trennungsprodukte wieder vereinigt, gaben jedoch ebenfalls keine Wirkung. Es ist daraus zu entnehmen, daß wirksame Insulinpräparate durch diese Behandlung zwar zerlegt, jedoch nicht wieder reaktiviert werden können.

Der Einfluß der Ionenreaktion.

Da bekannt ist, daß das Wirkungsoptimum der Enzyme von der Wasserstoffionenreaktion abhängt, so ist leicht einzusehen, daß es eventuell schon genügt, die p_H zu ändern, um ruhende Enzyme ihre Wirksamkeit entfalten zu lassen; doch zeigen schon die rohen Versuche, daß man ein solches im Insulin, welches ja im vivo-Versuch ausgewertet wird, nicht ohne weiteres feststellen kann, da einerseits der vivo-Versuch von zu vielen Faktoren beeinflußt wird, andererseits die injizierte Flüssigkeit sich binnen ganz kurzer Zeit und noch vor Eintritt der Wirkung an die p_H-Konzentration des Körpers (etwa 7,5) anpaßt. So haben auch die angestellten Versuche gezeigt, daß gleiche Mengen Insulin in alkalischer, neutraler oder saurer Lösung die gleiche Wirkung hatten, und zwar haben 9 mg des Insulins Phiag in alkalischer Lösung eine Herabsetzung von 0,17 Proz. auf 0,12, in neutraler von 0,15 auf 0,1 Proz., dagegen in saurer Lösung von 0,16 auf 0,1 Proz. bewirkt. Diese geringen Differenzen in extremen Fällen lassen eine weitere Differenzierung und Nüancierung bei dieser Untersuchungsmethode nicht zu.

Versuch mit dem Biokatalysator aus Hefe.

Da die Darstellungsweise der Kinase eine umständliche, schwierige und vor allem auch kostspielig ist, so wurde Umschau gehalten nach einem Ersatzstoff, welcher dieselbe Wirkung zu entfalten vermag und der auch leichter zugänglich ist. Vor allem konnten solche in Betracht kommen, welche bei dem Zuckerabbau eine Rolle spielen. Beim Suchen nach solchen kam uns die Arbeit von *H. Haehn* und *H. Schifferdecker* (19) „Über die Natur der gärungsenzymaktivierenden Katalysatoren aus Hefesäften" zustatten. Von den dort angeführten Katalysatoren schien derjenige als der geeignetste, welcher durch 7stündiges Kochen des Hefepreßsaftes am Rückfluß bei eigensaurer Reaktion (p_H 5,9) gewonnen wurde und welcher schon keinerlei coenzymatische Eigenschaften gegenüber von einwandfrei ausgewaschener Acetondauerhefe zeigte. Von diesen „Schutzsaft" genannten Katalysator nehmen die Autoren an, daß er seiner Herstellungsart nach sowohl die von *Buchner* und *Haehn* dargestellte Antiprotease als auch das *Tholin*sche Vitamin enthalten dürfte.

Der Kürze halber soll der Ausdruck Schutzsaft beibehalten werden, obwohl hier nur von der katalytischen Eigenschaft desselben Gebrauch gemacht wird. Der Schutzsaft wurde auf folgende Weise gewonnen: 200 g mit destilliertem Wasser gewaschene Hefe wurden mit Quarzsand und Kieselgur unter Zerstörung der Zellen fein zerrieben und sodann gepreßt. Der Preßsaft wurde ausgekocht, filtriert und sodann 8 Stunden am Rückfluß gekocht. Die Ausbeute betrug 10 ccm [es läßt sich nach *M. Jacoby* (20), wenn mit einer hydraulischen Presse gearbeitet wird, die Ausbeute stark vergrößern]. Er zeigte p_H 5,8 und gab weder die Biuret- noch die Glyoxylsäurereaktion, die Xanthoproteinreaktion zweifelhaft, dagegen war die *Millon*sche Reaktion schwach positiv.

Insulin Chemosan, welches im blinden Versuch eine Herabsetzung von 0,15 auf 0,09 Proz. nach der Injektion zeigte, wurde mit 1 ccm des Schutzsaftes bei p_H 7,8 gemischt und 24 Stunden stehengelassen. Das Gemisch hatte injiziert eine sehr starke Wirkung. Der Blutzucker sank von 0,13 Proz. vor auf 0,045 Proz. nach der Injektion. Das Tier bekam starke Krämpfe, die zwar nach einer Zuckerinjektion von 30 ccm 5proz.

Lösung vorübergingen, jedoch nach einer Stunde wiederkehrten, so daß sich das Tier erst nach einer weiteren Zuckerinjektion beruhigte. Dieser Versuch zeigte deutlich, daß der Schutzsaft eine starke aktivierende Wirkung auf das Insulin auszuüben vermag. Auch hielt die Wirkung länger an als sonst Insulin zu wirken vermag. Noch nach 2 Tagen war der Blutzucker des Tieres unternormal (0,08 Proz.); erst am dritten Tage näherte er sich der Norm. Die Wirkung des Preßsaftes kann nur auf eine aktivierende bezogen werden, keineswegs wird man darin eine Proteinwirkung erblicken können, da der Schutzsaft keine für Proteine charakteristische Reaktionen gab. Die schwache Millonreaktion ist in dem Falle nur ein Kriterium für abgebaute Eiweißstoffe bzw. Aminosäuren.

Aus den Versuchen geht hervor, daß es tatsächlich Substanzen gibt, welche inaktives Insulin in aktives überführen können, woraus weiter folgt, daß Insulin präformiert sich im Pankreas befindet, von wo es nach Bedarf in entsprechender Menge dem Körper durch Aktivatoren zur Wirkungsentfaltung zugeführt wird. Weiter läßt sich daraus in praktischer Hinsicht folgern, daß nur so viel gewonnen werden kann, als präformiert vorhanden ist, und daß durch Behandlung mit aktivierenden Substanzen alles Vorgebildete nutzbar verwendet werden kann. In fermentchemischer Hinsicht zeigen die Versuche, daß das Insulin zur Entfaltung seiner Wirksamkeit eines weiteren Faktors bedarf. Es wirkt also, indem es durch Kinasen aktiviert, den Zucker in eine abbaufähige Form überführt, welcher dann durch Oxydationsfermente oder durch anorganische Sauerstoffüberträger oxydiert wird, doch ist letzterer Vorgang ein sekundärer und hat mit der Insulinwirkung nichts Gemeinsames. *Schittenhelm* (21) sieht demgegenüber das Insulin als Kinase an, welche auf ein im Körper vorhandenes glykolytisches Ferment einwirkt.

Zusammenfassung.

Die bisherigen Literaturangaben weisen darauf hin, daß das Insulin im Pankreas zum Teil in inaktiver Form vorliegt, analog wie es bei anderen Fermenten in der Form des Proferments der Fall ist. Das Coferment, welches zur Aktivierung notwendig ist, kann von vornherein dem Insulin als zufälliger Begleiter bei der Darstellung beigemengt sein, oder es kann am Verbrauchsort oder auf dem Wege dorthin sich demselben zugesellen.

Die angestellten Versuche hatten den Zweck, die Art dieser Aktivatoren festzustellen.

Dabei erwies sich die Oxydase aus den eosinophilen Granulis des Blutes als wirksam, dagegen war die Peroxydase, die durch eingreifende Verfahren aus Knochenmark hergestellt wurde, unwirksam; ebenso die Aldehydase aus der Leber.

Von den Substanzen, mit denen das Insulin auf dem Wege zu seinem Bestimmungsort in Berührung kommen kann, erwies sich die

Kinase aus dem Dünndarm als stark wirksam. Es wurde das Einwirkungsoptimum der beiden Substanzen mit p_H 7,3 bis 7,8 bestimmt. Durch Behandlung des Insulins mit Tonerde als Adsorbens kam es zu einer Aufhebung der Wirkung; das Insulin konnte jedoch durch Wiedervereinigung der Trennungsbestandteile nicht wieder aktiviert werden.

Die H·-Ionenkonzentration, die sonst bei Enzymen als Aktivator eine Rolle spielt, ist bei der Art der Anwendung des Insulins ohne Bedeutung, da das Insulin sich sofort nach der Injektion der Körperreaktion anpaßt. So konnten auch keine Wirkungsunterschiede bei mit verschiedenen p_H angestellten Versuchen gefunden werden.

Bei der Umschau nach leichter zugänglichen Ersatzstoffen für die Aktivatoren des Insulins erwiesen sich pflanzliche Oxydase (Tyrosinase) und Peroxydase aus Meerrettich als unwirksam. Dagegen zeigte ein 8 Stunden lang am Rückfluß gekochter Hefepreßsaft eine stark aktivierende Wirkung auf das Insulin, welche nicht auf Proteineinfluß zurückzuführen ist.

In praktischer Hinsicht kann man daraus folgern, daß bei der Darstellung durch Zusatz eines Aktivators sich die ganze in präformierter Form vorhandene Insulinmenge gewinnen lassen muß. In theoretischer Hinsicht, daß die Aufgabe des Insulins darin besteht, immer in entsprechender Menge durch Kinasen aktiviert, den Zucker in eine abbaufähige Form zu überführen, während es zur weiteren Oxydation des Zuckers der Einwirkung des Insulins nicht mehr bedarf.

Literatur.

1) *Collip*, Amer. Journ. of phys. **68**, 391, 1923. — 2) *Laufberger*, Klin. Wochenschr. 1924, S. 264. — 3) *R. Willstätter* und *H. Kernel*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **124**, 245, 1925. — 4) *E. Glaser*, Pharm. Monatsh. 1924, Nr. 1. — 5) *Collazo*, *Händel* und *Rubino*, Deutsch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 25. — 6) *W. Kühne*, Virchows Arch. f. Pathol. **39**, 130, 1867. — 7) *R. Haidenhein*, Arch. f. d. ges. Physiol. **10**, 557, 1874. — 8) *Pawlow* und *Schepowalnikow*, Diss. St. Petersburg 1899. — 9) *E. Glaser* und *G. Halpern*, diese Zeitschr. **161**, 121, 1925. — 10) *Glaser* und *Wittner*, ebendaselbst **151**, 279, 1924. — 11) *Podolinski*, Diss. Breslau 1876. — 12) *E. v. Stöcklin*, Trav. de l'institute de Botanique Genéve 1907, S. 17. — 13) *A. Neumann*, diese Zeitschr. **148**, 524, 1924; **150**, 256, 1924. — 14) *Derselbe*, Zeitschr. f. wiss. Biol., Abt. B, **2**, 46, 1925. — 15) *Abderhalden*, Biochem. Arbeitsmethod. **8**, 58. — 16) *Derselbe*, ebendaselbst **8**, 72. — 17) *J. R. Murlin*, *Clyde Sutter*, *A. A. Allen* und *H. A. Piper*, Proc. of. the soc. exp. biol. a. mod. **21**, Nr. 6. — 18) *E. Waldschmidt-Leitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **132**, S. 182. — 19) *Hugo Haehn* und *H. Schifferdecker*, diese Zeitschr. **138**, 209, 1923. — 20) *Abderhalden*, Biochem. Arbeitsmethod. **8**, 393. — 21) *Schittenhelm*, Deutsch. med. Wochenschr. 1925.

Die interferometrische Methode der Abderhaldenschen Reaktion und interferometrische Analyse fermentativer Prozesse.

Von

E. Kaufmann.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik Augustahospital, Köln.)

(Eingegangen am 11. August 1926.)

Mit verschiedenartigen Methoden hat man den Nachweis fermentativ bedingter Abbauprozesse versucht, deren jede sich zumeist nur auf die Feststellung eines einzelnen Teilvorgangs ihres zeitlichen oder zuständlichen Ablaufs bezieht, entsprechend der Charakteristik der gerade angewandten Methode. Die Verbindung mehrerer Methoden vermag den Vorgang von verschiedenen Seiten aus zu beleuchten und dadurch die Vieldeutigkeit eines Einzelvorgangs bestimmter zu fassen. In Modellversuchen können einzelne für die Wirkung notwendig erscheinende Faktoren durch solche, die im Reaktionssystem nicht zur Geltung gelangen, substituiert werden, und damit ihre obligate Anwesenheit, gegebenenfalls auch die Spezifität oder Unspezifität zur Anschauung gebracht werden. Durch solches Vorgehen können andererseits Fehler und Fehldeutungen vermieden werden.

Zum Nachweis der fermentativen Proteinolyse ist eine ganze Reihe von Methoden ausgebaut worden, die einerseits aus der Abnahme des im Reaktionssystem anwesenden Eiweißgehalts, andererseits aus dem qualitativen oder quantitativen Nachweis auftretender Eiweißspaltprodukte direkt die Fermentwirkung erschließen; daneben sind indirekte Methoden zur Anwendung gelangt, die die Veränderung physikalischer Eigenschaften als Kennzeichnung der Fermentwirkung benutzen. Unter ihnen sind die optischen Methoden, die hier einer Kritik zu unterziehen sind, zu nennen, insofern, als sie sich auf den Nachweis von Refraktionsänderungen als Ausdruck und Teilerscheinung des Fermentprozesses gründen.

Die optischen Verfahren bedienen sich des Refraktometers und Interferometers. Bei letzterem bietet außer der vielfach größeren Meßgenauigkeit auch die Möglichkeit der Differenzmessung in zwei nebeneinandergeschalteten Kammern besondere Vorzüge, weswegen die Interferometrie als dem Ziele der folgenden Untersuchung besonders entgegenkommende Methode herangezogen wurde. Die mit ihr gewonnenen Resultate lassen sich prinzipiell auf die Refraktometrie übertragen.

Grundsätzlich bestehen drei Möglichkeiten der Versuchsanordnung des Reaktionssystems:

1. Die Fermentwirkung wird durch Nachweis der *Auflösung eines festen Substrats* und dem *Übertritt von gelösten Substratanteilen*, oder durch den Nachweis der aus der Aufspaltung des Substrateiweißes entstehenden *Abbauprodukte* mit *direkten* und *indirekten Methoden* zur Anschauung gebracht (sogenanntes makroheterogenes System).

2. Die Fermentlösung wird dem *kolloiddispersen Substrateiweiß* zugesetzt, und das Auftreten von aus dem Eiweißzerfall herstammenden *Spaltstücken* und hochdispersen Baustoffen *direkt oder indirekt* nachgewiesen (mikroheterogenes System).

3. Den Übergang zwischen beiden Verfahren bildet die Einführung einer grobdispersen, makroskopisch getrübt oder geflockt erscheinenden Substratlösung (halbmikroheterogenes System). Auch hierbei kann die Fermentwirkung direkt oder indirekt zur Darstellung gelangen.

Hierzu ist folgendes zu bemerken:

Zu 1. Die Auflösung des — immer vorausgesetzt brauchbaren — Substrats kann sowohl durch einfache Peptisierung als auch durch Proteolyse bewirkt werden. Die Spezifität oder Unspezifität letzterer resultiert erst aus der Empirie ausgedehnter Reihen- und Serienversuche. Die Frage nach der Herkunft etwa auftretender niederer Eiweißbausteine hat zu trennen zwischen Entstehung aus dem Substrat und der Fermentlösung, falls beide Eiweißkörper enthalten, d. h. also, wenn die nachzuweisenden Fermente in einer Eiweißlösung, z. B. im Serum, enthalten sind oder gesucht werden. Im letzteren Falle kann es sich um Autolyse handeln.

Zu 2. Die Spezifität der Reaktion resultiert auch hier aus dem eindeutig determinierten Effekt in Reihen-, Serien- und Kontrollversuchen. Als Ursprungsstätte neugebildeter Abbauprodukte ist auch zwischen Substrat- und Fermentlösung zu scheiden, falls beide Eiweißlösungen sind.

Zu 3. Es gelten teils die zu 1, teils die zu 2 festgelegten Gesichtspunkte.

Aus dem Gesagten geht bereits hervor, daß zumeist nur die Anwendung von mindestens zwei, besser noch *mehr Methoden zu verwertbaren Resultaten* führen kann, da sie verschiedene Äußerungen eines Gesamtvorgangs analysieren und sich wechselseitig kontrollieren. Die interferometrische Methode vermag sich aller drei Anordnungen zu bedienen. Sie besitzt große Empfindlichkeit und hohe Meßgenauigkeit. Der mit ihr erzielte Ausschlag oder Effekt kann sich kundgeben in einer Vermehrung, Verminderung, jedoch auch im Konstantbleiben (d. h. praktisch fehlender Effekt) des Refraktionswertes. Eine methodologische Untersuchung über die möglichen Ursachen für das Zustandekommen von Refraktionsänderungen überhaupt muß deswegen vorangeschickt werden.

I. Die interferometrische Methode (Prinzip und Handhabung).

Beim Refraktometer wird der Grenzwinkel der totalen Refraktion als Ausdruck einer gesetzmäßigen Beziehung zum Brechungsvermögen der zu untersuchenden Lösung direkt gemessen und in Gestalt der Lichtschattengrenze auf der Skala des Apparats abgelesen. Das Flüssigkeitsinterferometer, das von *Löwe* nach dem *Rayleigh*schen Prinzip gebaut ist, benutzt eine Differenzmethode, um geringste Konzentrationsänderungen im Vergleich mit einer Standardlösung zu messen[1]).

[1]) Eine genaue Beschreibung der Apparatur und Methode kann hier unterbleiben. Sie findet sich in der angegebenen Literatur.

Die Fehlerbreite bei dem von mir verwandten Interferometer (Nr. 17403) beträgt für die 1-mm-Kammer $n_D = \pm 0{,}0000087$, für die 5-mm-Kammer $\pm 0{,}000\,000\,19$. Die Genauigkeit des Eintauchrefraktometers beträgt $\pm 0{,}000037$, bei Dispersions- und Differenzmessungen 0,000 01 bis 0,000 02. Demnach ist unsere 1-mm-Kammer vierfach, die 5-mm-Kammer etwa 18fach genauer (Einzelheiten erste Mitteilung).

Die ermittelten Zahlen entsprechen der Änderung des Brechungskoeffizienten bei Verschiebung um einen Trommelteil des benutzten Interferometers, ermöglichen also allein noch keine Bewertung des Apparats, da die Möglichkeit kleiner Ablese- oder Meßfehler besteht. Größere Schwierigkeit bietet vor allem die Auswahl und Erkennung des richtigen Streifenpaares. Auf die Möglichkeit der Streifenverwechslung ist von verschiedenen Seiten (*Dörr* und *Berger*, *Hirsch*, *Langenstrahs*, *Löwe*, *Marc*, *Schmeel*) hingewiesen worden. Diese macht sich vorwiegend bei Ausmessung kolloidaler Lösungen gegen kristalloide Vergleichslösung oder Wasser geltend und kommt, soweit es sich im folgenden um Differenzmessungen nahezu gleichartig beschaffener Flüssigkeiten handelt, außer Betracht. Ursache dieser Perioden, d. h. des sprungartigen Vorrückens der Einstellung um ein Streifenpaar bei gleichmäßiger Konzentrationszunahme, suchen *Gans* und *Bose* in der verschiedenen Dispersion des Kolloids auf der einen und des Kompensators auf der anderen Kammerseite. Wie ich an anderer Stelle ausgeführt, scheint das Zustandekommen der *Marc*schen Perioden durch Inkohärenz des Lichtes bei Durchgang durch verschieden disperse Medien bewirkt zu werden. *Hirsch* verwertet die farbigen Randsäume zur richtigen Ablesung, *Marc* das Symptom des sich Auseinanderziehens falscher bunter Streifenränder beim Hin- und Herbewegen des Auges vor dem Okular. Ich selbst benutzte, wie a. a. O. ausgeführt, die Bestimmung mehrerer Streifenpaare manchmal zur Kontrolle der Ablesung.

Exakte interferometrische Messungen haben zur Voraussetzung die Benutzung monochromatischen Lichtes von bestimmter Wellenlänge, gleichmäßigen Druck und Temperatur, durch welche der Brechungsquotient beeinflußt wird. Gerade der Einfluß der Temperatur bedingt einen wesentlichen Ausschlag, der stärker ist als beispielsweise der des spezifischen Gewichts. Außerdem verursacht der Verdunstungsfaktor Schwankungen, die abhängig sind vom prozentualen Verdunstungsbetrag — verschieden je nach verdunstender Oberfläche (Kammergröße) und Konzentration der untersuchten Lösung, Luftfeuchtigkeit, Luftbewegung und Außentemperatur — als auch von der Wasserdifferenz, d. h. dem Unterschied im H_2O-Gehalt beider Kammerseiten.

Bei Differenzbestimmungen nahezu gleich konzentrierter und beschaffener Lösungen in beiden Kammern, um die es sich bei den folgenden Untersuchungen zumeist handelt, erfordern diese Faktoren keine Berücksichtigung.

II. Die Refraktion von Mischungen.

Der Brechungskoeffizient einer Flüssigkeit ist das Verhältnis der Lichtbrechung zwischen dieser und Luft (relativer Brechungskoeffizient). Physikalisch ist streng genommen nur die Reduktion auf den luftleeren Raum angängig (absoluter Brechungskoeffizient). Im Vergleich zu diesem = 1 ist die Lichtbrechung der Luft dann 1,000 29, für unsere Zwecke, wo stets die Refraktion von Flüssigkeiten bestimmt wird, zu vernachlässigen. Die Brechung einer Flüssigkeit hängt ab von der Lichtgeschwindigkeit durchfallender Strahlen. Im optisch dichteren Medium ist die Licht-

geschwindigkeit geringer und ebenso umgekehrt. Bei Änderung der Fortpflanzungsgeschwindigkeit c ändert sich proportional auch die Wellenlänge η, so daß die Schwingungszahl v konstant bleibt $\left(\frac{c}{\eta} = v\right)$. Auch die Dispersion des Lichtes, verursacht durch das Mitschwingen der Moleküle, ist von Einfluß auf die Brechung. Die Dichte (oder spezifisches Gewicht $= d$) einer Flüssigkeit ist gesetzmäßig mit ihrem Brechungsexponenten (n) verknüpft. Mit wachsender Dichte nimmt auch der Brechungsindex zu. Für die Gesetzmäßigkeit der Beziehung zwischen Dichte und Brechung sind eine Reihe von Formeln, unabhängig von Temperatur und Druck gültig, aufgestellt worden (*Newton*, *Gladstone*, *Dale*). Empirisch gut bestätigt ist die *Lorentz-Lorenz*sche Formel:

$$R = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d}.$$

Die *spezifische* Refraktion R ist eine dem betreffenden Stoffe zukommende, unveränderliche Funktion. Das Produkt dieser spezifischen Refraktion R und des Molekulargewichts M bildet die Molekularrefraktion MR.

$$MR = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{d}.$$

Diese ist hauptsächlich abhängig von der Art der gelösten Moleküle und setzt sich praktisch zusammen aus der Summe der Einzelrefraktionen der Atome. Ausnahmen kommen vor. Insofern, als eine Lösung bereits eine Mischung von Lösungsmittel und gelöster Substanz bildet, kommen für diese, insbesondere aber für Mischungen verschiedener Flüssigkeiten, Einflüsse zur Geltung, die mit der besonderen Natur der Lösung und des Gemisches zusammenhängen. Die Dissoziation beeinflußt den Brechungsquotienten insofern, als die freien Ionen ein größeres Brechungsvermögen als im nichtdissoziierten Molekül besitzen, z. B. $H^{\cdot} > H$ in H_2O. Auch die Art der Bindung von Atomen (Doppelbindungen usw.), die Hydratation, Polymerisation, Kondensation und die Bildung von Molekül- und Micellenaggregaten ist nicht bedeutungslos. Diese Faktoren sind beispielsweise zur Analyse organischer Substanzen (Ringbildungen heterozyklischer Systeme, Verkettung von Aminosäuren) herangezogen worden. *Hirsch* hat, ebenfalls interferometrisch, den Einfluß der Aufnahme von Hydratwasser bei der hydrolytischen Spaltung von Dipeptiden auf das Brechungsvermögen untersucht und bei verschiedenen Dipeptiden einen gleichmäßigen Wert (J. W.) als Ausdruck der Brechungszunahme gefunden.

Bei der Refraktion von Gemischen liegen die Verhältnisse schwieriger als bei einfachen Substanzen. Insofern die Brechungsvermehrung eines Stoffes refraktometrisch aus dem Grenzwinkel seiner totalen Reflexion bzw. durch den Brechungswinkel bei streifender Incidenz, die eine Funktion der optischen Lichtbrechung darstellen, interferometrisch aber aus den Wellenlängen des Lichtes bei Durchgang durch zwei Kammern mittels einer Nullmethode, in allen Fällen also aus dem Verhältnis zweier Lichtgeschwindigkeiten ermittelt werden, gilt das im folgenden Gesagte für beide Methoden. Der Einfluß verschiedener Wellenlängen, bei der ersteren Natrium- oder achromatisiertes Tageslicht, bei letzterer das Licht einer Osrambirne, tritt beim Vergleich der mit beiden Methoden gefundenen Brechungsindices in Erscheinung. Die hieraus sich ergebenden Abweichungen sind praktisch geringfügig.

Die spezifische Refraktion echter Gemische, insbesondere der Mischungen von Flüssigkeiten, läßt sich additiv aus den Einzelrefraktionen und den zur Mischung gelangenden Voluminis berechnen. Genaue Untersuchungen von physikalischer Seite haben gezeigt, daß die Annäherung der theoretisch gefolgerten an die empirisch gefundenen Werte so groß ist, daß brauchbare praktische Resultate erzielt werden. Das Fehlen einer absoluten Übereinstimmung und absoluten Gültigkeit des Mischungsgesetzes wird erklärt durch eine Anzahl physikalischer Vorgänge, die beim Mischen statthaben können. Bei Substanzen, die eine chemische Reaktion, wie z. B. Substitution, Oxydation, Reduktion als auch Salzbildung aus Basen und Säuren, um nur die einfachsten zu nennen, eingehen, die also keine Mischungen darstellen, wie das hinsichtlich der Salzbildung bei der Reaktion $HCl + KOH = KCl + H_2O$ zutrifft, zeigen sich starke Abweichungen vom additiven Verhalten. Diese sind zurückzuführen auf Volumänderungen (Kontraktion und Dilatation) und entsprechende Änderungen von spezifischem Gewicht, Druck und Dissoziation beim Lösungsvorgang. Bei echten Gemischen sind diese Faktoren nicht von Bedeutung, so daß das Mischungsgesetz Anwendung finden kann. Mischungen von KCl- und Na Cl-Lösungen, die stark dissoziiert sind, verhalten sich in hohen Konzentrationen fast genau additiv. Auch Verdünnungskurven des normalen, mit physiologischen Lösungen verdünnten Serums zeigen Übereinstimmung der gefundenen mit den berechneten Werten. Auf die Wiedergabe kann der Kürze halber verzichtet werden. Die „physiologischen" Salzlösungen scheinen dem normalen Blutserum bzw. -plasma gegenüber neutraleres Verhalten zu zeigen als Wasser, welches für dessen feinere Zusammensetzung nicht ganz so indifferent ist, wie jene. Unter Anwendung genau isotonischer, gut äquilibrierter Salzlösungen, wie sie allein aus später zu erörternden Gründen in Frage kommen, sind die Prämissen einer echten Mischung praktisch gegeben. Bei pathologischen Seren aber ist dies Verhalten weniger ausgesprochen, worauf ja gewisse unspezifische Kolloid- oder Labilreaktionen beruhen.

Aus der Kenntnis der Refraktion der einzelnen Lösungen N_1 und N_2 kann daher die Refraktion der Mischung N berechnet werden, wenn man die Einzelvolumina v_1 und v_2 kennt und nach erfolgtem Temperatur- und Druckausgleich keine Volumenänderung stattgehabt hat, was pyknometrisch festzustellen ist. Dem Mischungsgesetz liegt die Formel zugrunde

$$\mathfrak{N}_1 \cdot v_1 + \mathfrak{N}_2 \cdot v_2 = \mathfrak{N} \cdot (v_1 + v_2).$$

Hieraus ergibt sich

$$\mathfrak{N} = \frac{(\mathfrak{N}_1 \cdot v_1) + (\mathfrak{N}_2 \cdot v_2)}{v_1 + v_2},$$

woraus auch bei Unbekanntheit einer Größe diese aus den übrigen berechnet werden kann. $\mathfrak{N}$ ist in dieser Gleichung der um 1, d. h. um die Einheit von Luft bzw. luftleerem Raum verminderte Brechungsindex $N - 1$, kurz der Brechungszuwachs. *Pulfrich* hat diesen Brechungszuwachs der Berechnung von Volumenänderungen zugrunde gelegt. Es ist nicht angebracht und auch weniger genau, statt $\mathfrak{N}$ die Skalenteile des Refraktometers, die keine strenge Kongruenz mit dieser besagten Brechungsvermehrung aufweisen, wie früher gezeigt worden ist (erste Mitteilung, S. 420 bis 425), der Mischungsformel zugrunde zu legen. Bei der interferometrischen Methode entsprechen unter Verwendung von Aqua dest. als Standardflüssigkeit die gefundenen J. W. dem um den *Wasserwert* (1,333 32) verminderten Brechungs-

quotienten bei linearem Verlauf bzw. linearem Ausgleich der Interferometerkurve und können in die Gleichung an Stelle von $\mathfrak{N}_1$, $\mathfrak{N}_2$ und $\mathfrak{N}$ treten, wodurch sich die Ausrechnung sehr vereinfacht.

Bei Mischungen von Flüssigkeiten und Lösungen, die miteinander chemisch reagieren, ist nach dem Gesagten eine quantitative Analyse schwierig. Bei biologischen wie den Immunitätsreaktionen hat die Interferometrie nur den Wert einer qualitativen Methode, aber auch nur dann, wenn eine Erhöhung oder Erniedrigung der Brechung, nicht aber Gleichbleiben zur Feststellung gelangt (s. auch *Dörr* und *Berger*), was zum Teil wiederum aus der Wahl der unter 1 bis 3 beschriebenen Reaktionssysteme sich ergibt.

III. Die Refraktion bei fermentativer Eiweißspaltung.

Obermeyer und *Pick* fanden für die Refraktion bei Fermenteinwirkung in der Tat alle drei möglichen Formen der Brechungsänderung, geringe Zunahme bei Trypsin, Gleichbleiben bei Pepsin und Abnahme bei bakteriellen Prozessen. Demgegenüber hat *Hirsch* auch bei Pepsinverdauung interferometrisch in Untersuchungen mit monochromatischem Licht Refraktionserhöhung festgestellt. *Dörr* und *Berger* fanden bei der Trypsinverdauung von Eiweiß nur geringe Refraktionszunahme.

Zu den proteolytischen Fermenten gehören die Immunofermente. *Pfeiffer* und *Mita* stellten beim Studium der Anaphylaxie an Meerschweinchen, die durch Antigeninjektionen anaphylaktisch gemacht wurden fest, daß deren Serum mit Antigenserum der Vorbehandlung im Reagenzglase zum Auftreten Biuretreaktion gebender Spaltprodukte führte, ohne daß sie diesen Vorgang als spezifisch bezeichneten. *Sachs* vertritt die Auffassung, daß es sich dabei um eine spezifisch ausgelöste, aber unspezifische Serumautolyse handelt. Gleichzeitig und unabhängig von *Pfeiffer* und *Mita* gelangte *Abderhalden* zum Nachweis von Abwehrfermenten. Nach seiner Lehre, in deren Mittelpunkt die spezifische Schwangerschaftsreaktion steht, sind diese Fermente streng spezifisch eingestellt, wofür bisher ein sicherer Beweis noch nicht erbracht wurde. *Kupelwieser* und seine Mitarbeiter *Wastl*, *Navratil* und *Wertheim* fanden unter Anwendung der refraktometrischen Methode von *Pregl* und *de Crinis* keine Refraktionsvermehrung bei Zusatz des koagulierten Trockenproteins aus Antigenserum zu Immunserum — als Kennzeichen fermentativer Spaltung des Antigeneiweißes. Wenn hierbei durch die Präparation des letzteren zu einem Trockenpräparat möglicherweise der Charakter der Antigen-Immunserumreaktion gestört ist, so ist nach den im folgenden zu beschreibenden Versuchen mit einem positiven Refraktionsausfall solcher Versuche im mikroheterogenen System nicht zu rechnen.

Auch die Mikro-Abderhaldenreaktion zum Schwangerschaftsnachweis unter Anwendung der gleichen Methode führte *Kupelwieser* nicht zu positiven, als Ausdruck der Fermentwirkung zu deutenden Ergebnissen. Dasselbe negative Resultat hatte auch *Serejski* bei gleichzeitiger Anwendung der Mikroabderhaldenreaktion und der chemischen Methode von *Bach* zum Nachweis von Spaltprodukten. Mehrfach hat *Abderhalden* auf die nahe Beziehung seiner Abbaufermente zu den Immunofermenten und den Immunitätsreaktionen hingewiesen. *Dörr*, sowie *Dörr* und *Berger* zeigten für den Vorgang der Immunpräzipitation, daß die erste Phase dieser bis zum Auftreten der Flockung im Gegensatz zu den Angaben von *Hirsch* und *Langenstrass* nicht von Refraktionsausschlägen begleitet ist. Dasselbe fanden auch

Bachmann u. a. für die erste Phase der *Wassermann*schen und übrigen Luesreaktionen. Gleiches gilt für die spezifische Agglutination und Toxin-Antitoxinbindung. Es wundert dies nicht, wenn man berücksichtigt, daß der *Einfluß von Änderungen des Dispersitätsgrades auf die optische Dichte im Verhältnis zu dem geringer chemischer Umsetzungen äußerst klein ist.*

IV. Interferometrische Analyse von Fermentwirkungen.

1. Im makro-heterogenen System.

In diesem Abschnitt wird nur die interferometrische Methode der A. R. nach *Hirsch* einer Prüfung unterzogen, und zwar hinsichtlich der Brauchbarkeit der Organtrockenpräparate als auch der Zuverlässigkeit der Versuchsanordnung. Peptische und proteolytische Fermentwirkungen gelangen im makroheterogenen System nicht zur Untersuchung, da sie bereits vielfach solcher unterzogen wurden und bekanntlich starke Brechungserhöhung durch Substratverdauung bewirken.

Technik der Versuche. Die Blutentnahme erfolgt morgens und, um die Einwirkung von Verdauungsfermenten und Muskelbewegung, die nach Angabe von *Venulet* zur Auswirkung kommen, auszuschalten, soweit als tunlich am nüchternen, ruhenden Menschen aus der Cubitalvene unter strenger Asepsis. Wenige Kubikzentimeter Blut erwiesen sich ausreichend. Nach Gewinnung eines klaren, nicht chylushaltigen oder hämolytischen, sowie körperchenfreien Serums wurde dieses noch am gleichen Tage angesetzt. Der anfängliche Zusatz von Vucin in bekannter Weise[1]) unterblieb später ohne Beeinträchtigung der Versuche. Die Sterilität der Proben wurde durch *Ausstrich* auf Schrägagar kontrolliert.

Jedes Serum wurde dreifach angesetzt in kleinen, etwa 0,8 ccm fassenden Spitzröhrchen, am besten aus Jenaer Glas, deren offener Teil einen ausgebörtelten Rand trägt. Eins dieser Gläschen wurde unter aseptischen Kautelen mit dem Inhalt eines bestimmten Organpräparats (Opzime „Pharmagans") beschickt, alle drei alsdann nach der Vorschrift von *Hirsch* mit 0,5 ccm sterilem Serum gefüllt und mit Gummikappen, wie sie bei der Insulinpackung Verwendung finden, luftdicht, verdunstungssicher und infolge des ausgebörtelten Randes festsitzend verschlossen. Die Serumsubstratprobe sowie eine Serumkontrolle kamen 24 Stunden in den Thermostaten bei 37° C, die weitere Kontrolle wurde ebensolange im Eisschrank bei etwa 8° C aufbewahrt.

Nach Ablauf von 24 Stunden wurden sämtliche drei Proben derartig interferometrisch gemessen, daß die Serumsubstratprobe, danach die im Eisschrank untergebrachte Kontrolle in der linken Kammer, die Brutschrankkontrolle jedoch stets in der rechten Kammer zur Ausmessung gelangten. Demnach diente diese letztere gleichsam als Vergleichsflüssigkeit. Die Messung geschah sowohl in der Mikro- als auch 5-mm-Kammer, ohne daß dazu eine Überführung erforderlich wäre, da bekanntlich nach erfolgter Bestimmung der T. T.-Differenz in der letzteren mit dem Einsetzen der planparallelen Glasplatte die 1-mm-Kammer hergestellt ist. Die im folgenden

[1]) Einzelheiten der Methodik sind wiederholt beschrieben worden, ihre Wiedergabe kann hier unterbleiben.

angegebene T. T.-Erhöhung bezieht sich also stets auf die Differenzbestimmung der Substrat- gegen die Serumprobe. Nur in Tabelle V ist auch die Brechungszunahme bei Aufbewahrung im Thermostaten mit eingefügt. Die doppelte Ansetzung als auch verschiedene Aufbewahrung der Kontrollen ermöglichte, den Ausfall der Agarkulturen zu sichern und die durch Wärmeeinfluß erzeugten optischen Veränderungen darzustellen.

Die simultane Verwendung der 5-mm-Kammer verbürgte eine fünffache Genauigkeit als auch die Verwechslung von Streifenpaaren bei der 1-mm-Kammer mit Sicherheit auszuschließen, was um so wichtiger war, als die unter Anwendung dieser Kammer zutage tretenden Brechungszunahmen nahezu den Wert eines Streifenpaares betrugen. Die bei kolloiden Lösungen, wie bereits erörtert, erschwerte Wahl des richtigen Streifenpaares machte bei den geringen Konzentrationsdifferenzen beider verglichener Flüssigkeiten keine Schwierigkeiten, auch die Abhängigkeit von äußeren physikalischen Faktoren war infolgedessen praktisch ohne Belang. Die Messung verdünnter Sera in 5 mm Schicht bot nur gelegentlich infolge Trübung des Substratserumgemisches Schwierigkeiten. Diese Trübungen waren jedoch nicht Folge einer Infektion. Die Wiedergabe der mit der größeren Kammer ermittelten Werte, die mit den übrigen im Verhältnis der Kammergrößen gut übereinstimmten, kann der Kürze und Meidung von Wiederholung wegen fortgelassen werden. Da sich die übrigen Untersucher der Mikromethode bedienten, ist die Angabe der mit dieser gefundenen Werte auch hier geboten.

Tabelle I gibt die Resultate von 43 Untersuchungen mit der angegebenen Methode wieder bei Verwendung von Placentasubstrat. Die Serumsubstratproben zeigen eine durchschnittliche Dichtezunahme

Tabelle I.

Nr.	Diagnose	T. T. +	Nr.	Diagnose	T. T. +
1.	Grav. m. V	25	23.	Grav. m. X	22
2.	„ „ V	14	24.	„ „ X	28
3.	„ „ V	8	25.	„ „ X	13
4.	„ „ V–VI	23	26.	„ „ V–VI Lues	31
5.	„ „ VI–VII	18	27.	„ „ VIII–IX Lues	27
6.	„ „ VII–VIII	29	28.	„ „ IX Lues	20
7.	„ „ VII–VIII	11	29.	„ „ X „	16
8.	„ „ VII–VIII	23	30.	Gynäkol. Erkr.	8
9.	„ „ VIII	23	31.	„ „	10
10.	„ „ VIII	15	32.	Mitralinsuff.	20
11.	„ „ VIII	4,5	33.	Erysipel	17
12.	„ „ VIII–IX	24	34.	Polyarthritis	11
13.	„ „ VIII–IX	29	35.	Tbc. pulmon.	6
14.	„ „ IX	14	36.	Multiple Skler.	7
15.	„ „ IX	21	37.	Erisipel	12
16.	„ „ IX	18	38.	Epilepsie	38
17.	„ „ IX	19	39.	Gesund w.	28
18.	„ „ IX	10	40.	„ „	33
19.	„ „ IX	26	41.	„ m.	27
20.	„ „ IX–X	26	42.	„ „	24
21.	„ „ IX–X	27	43.	„ „	22
22.	„ „ X	25			

von 19,9 T. T. gegenüber dem Serum allein, wobei *kein Unterschied zwischen Schwangeren der letzten 5 Monate, inneren Kranken und Gesunden beiderlei Geschlechts* feststellbar waren. *Auch* entsprechende Versuche mit *Ovarium* zeigten dieses und zumeist übereinstimmende Ergebnisse (Tabelle II).

Tabelle II.

Serum von Gravida	Placenta	Ovar	Serum von Gravida	Placenta	Ovar
	T. T.-Zunahme			T. T.-Zunahme	
K. G.	26	35	*L. H.*	28	25
A. O.	27	30	*H. S.*	33	33

Die *Abgabe löslicher Substanzen* seitens der Versuchsgläschen und Gummikappen kann als Ursache der Refraktionserhöhung ausgeschlossen werden, da bei sorgfältiger Innehaltung aller Vorschriften außerdem nicht einzusehen wäre, warum zwischen Substratserum und Serum alsdann ständig eine in einer Richtung verlaufende Konzentrationsdifferenz vorhanden sein sollte. Das gleiche gilt auch für etwaige *Verdunstungsfehler*, die bei der Art der Versuchsanordnung — Gummiverschluß, Umschütteln vor der Messung — auch nicht möglich sein konnten. *Bakteriologische* Zersetzung wurde durch bakteriologische Kontrolle ausgeschlossen. Die *Refraktionserhöhung* muß demnach *auf die Anwesenheit von Substrat im Serum zurückgeführt* werden.

Die einfachste Erklärung basiert auf der Möglichkeit spontaner Substratlösung. Bei entsprechender Behandlung verschiedenster Substrate, wie Placenta, Ovarium, Testikel, tuberkulöse und normale Lunge, Leber, Milz, Tuberkelbazillen *mit physiologischer Kochsalzlösung* ergaben sich *Erhöhungen*, die den Wert von *5 T. T.* nicht überschritten. Das gleiche war auch für Serum-Ultrafiltrate, 6proz. Gummiarabikumlösung und wasserfreies Glycerin nachweisbar. Ein Beispiel eines solchen Versuchs mit Lymphdrüsen bietet Tabelle III. Zum Vergleich dienen entsprechende Versuche mit einem schwerlöslichen Skleroprotein (Kollagen *Kahlbaum*), wobei ein deutlicher Konzentrationszuwachs festzustellen war. Im selben Sinne war der Ausfall der Sulfosalicylsäure- und Trichloressigsäureprobe. Bei Durchsicht dieser Tabelle ist zu beachten, daß reines Glycerin an sich bereits mit beiden Eiweißreagenzien starke Opaleszenz gab. Eine Substratquellung wurde durch ein noch später zu schilderndes Verfahren ausgeschaltet, da teilweise konzentrierte Lösungen verwandt wurden (Gummi und Glycerin), die auf diesem Wege bereits Konzentrationserhöhung bedingen konnten.

Als Ursache der ermittelten Brechungszunahme und als Fehlerquelle kam noch in Betracht eine durch *Quellung des Trockensubstrats* bedingte Änderung des Serums sowohl hinsichtlich Konzentrierung als auch Auslösung von Autolyse und anderen physikalisch-chemischen Prozessen.

Tabelle III.

Art des Lösungsmittels	Art des Substrats (5 mg auf 0,5 ccm)					
	Lungenlymphdrüse			Collagen		
	T.T.-Änderung	Eiweißproben*) vor	Eiweißproben*) nach	T.T.-Änderung	Eiweißproben*) vor	Eiweißproben*) nach
		24 Std. Aufbew. bei 37° C			24 Std. Aufbew. bei 37° C	
1. Inaktiviertes eiweißfreies Normalpferdeserum	0	klar	klar	?	Sp.	+
2. Inaktiviertes eiweißfreies Normalmenschenserum	+ 6	Tr.?	Tr.?	+ 56	+	+
3. Serumultrafiltrat (Mensch) . .	0	klar	klar	+ 27	+	++
4. Isoviscom 6proz. Gummi-arabicum-Lösung	— 2	klar	klar	+ 32	—	Sp.
5. Glycerin, wasserfrei	+ 2	st. Op.	st. Op.	+ 18	+	+
6. 0,9 proz. NaCl-Kontrolle . . .	— 1	klar	klar	+ 34	Sp.	+
7. H_2O-Kontrolle	—	—	—	+ 44	—	+

*) Sulfosalicylsäure und Trichloressigsäureprobe:
Tr. = Trübung, st. Op. = starke Opaleszenz, Sp. Spur Fällung, + = Fällung, ++ = deutliche Fällung.

Das Substrat konnte durch Kontakt und Oberflächenentfaltung Einfluß haben. Eine Adsorptionswirkung mußte dagegen entgegengesetzten Einfluß auf die optische Dichte besitzen. Erst die Ausschaltung aller dieser Faktoren konnte einen Einblick in die Beziehung zwischen Substrat und Serum und ihres Verhaltens zum Brechungsindex bringen, was jedoch praktisch nicht durchzuführen ist.

Es wurde deswegen zunächst getrachtet, durch *Änderung von Einwirkungsdauer und Substratmenge* Licht auf den Vorgang zu werfen. Tabelle IV zeigt den Einfluß der Zeitdauer und am Schluß die ge-

Tabelle IV.

Dauer des Brutschr.-Aufenth. Stdn.	T.T.-Zunahme Serum + Placenta	T.T.-Zunahme Serum Kontrolle	Dauer des Brutschr. Aufenth. Stdn.	T.T.-Zunahme Serum + Placenta	T.T.-Zunahme Serum Kontrolle	Dauer des Brutschr.-Aufenth. Stdn.	T.T.-Zunahme Serum + Placenta	T.T.-Zunahme Serum Kontrolle
12	18	4	24	20	4	48	23	0
	20	8		22	—		29	0
	19	2	36	28	4		24	— 4
	5	6		29	0		27	0
24	15	4		18	4		31	—
	10	5		13	1		28	—
	11	4		26	3			
	16	3		27	2	Mittelwerte:		
	14	3		28	4	12	15,5	5
	22	2		33	2	24	17,5	4
	14	7		27	0	36	25,4	2,2
	24	—	48	24	6	48	28,6	1
	25	4		27	2			

fundenen Mittelwerte, aus denen hervorgeht, daß eine merkliche weitere Dichtezunahme noch zwischen 24 und 36 Stunden besteht, die nach weiteren 12 bis zu 48 Stunden nur gering ist. Auf Grund der nachfolgenden Versuche, in denen die Substratquellung analysiert und von der Einflußnahme auf die optische Änderung im Reaktionssystem ausgeschlossen wird, ist diese Zunahme zum Teil auf eine *Reaktion zwischen Substrat und Serum* zurückzuführen. Die Frage jedoch, welcher Natur diese ist, bleibt allerdings damit noch unbeantwortet. In ähnlicher Weise ist auch die Variation der Mengenverhältnisse von Substrat und Serum, die durch Abstufung der Substratmenge erreicht wurde, von Effekt auf den Dichtezuwachs bei 24stündiger Bebrütung. Tabelle V demonstriert, daß dieser Effekt immer zugunsten der größeren

Tabelle V.

Graviden-Serum Nr.: Menge Substrat g	1 T.T.	2 T.T.	3 T.T.	4 T.T.	5 T.T.	6 T.T.	7 T.T.	8 T.T.	Mittel T.T.-Zunahme
Placenta 0,0025	15	—	—	—	—	—	—	—	—
„ 0,005	24	28	31	38	13	27	28	33	$27^3/_4$
„ 0,0075	—	—	36	—	—	—	—	—	—
„ 0,01	—	32	—	77	48	60	47	44	$51^1/_3$

Substratmenge bei Anwendung desselben Serums beobachtet wird. Auch hier zeigt sich bei Ausschaltung der später studierten Substratquellung und der durch sie bedingten Konzentrierung nach ungefährem Abzug ihres Anteils noch ein Überschuß von Refraktionserhöhung, der auf eine *Reaktion zwischen Substrat und Serum* hinweist. Die Anzahl der Versuche ist allerdings gering, erweist jedoch, daß durch *Verlängerung der Einwirkungsdauer über 24 Stunden* und *Verdoppelung* der von *Hirsch* geforderten *Substratmenge, das Reaktionsoptimum noch keineswegs überschritten* ist. Dieser Nachweis widerspricht nicht unseren Auffassungen und Kenntnissen von fermentativen Prozessen, ist aber auch nicht ein genügendes Merkmal zur Identifizierung des Vorgangs mit solchen.

Es bleibt somit noch festzustellen, in welcher Weise Zusatz von Trockensubstratpulver, im engeren quellbaren oder bereits gequollenen Substratteilchen einflußgebend auf den physikalisch-chemischen Zustand des Serums ist. Die Veränderung der Refraktion durch Adsorption von Serumbestandteilen an das Substrat kann nicht isoliert bestimmt werden, da Substratauflösung und Abbau gegensinnig, d. h. erhöhend, einwirken und den Adsorptionseffekt aufheben. Versuche mit feinsuspendierter *Kohle und Kaolin* (*Merck*), bei denen diese Faktoren, falls die Pulver chemisch rein und unlöslich sind, ausgeschlossen werden

können, zeigen nun in Tabelle VI mit einer *einzigen Ausnahme* die erwartete *Abnahme der Brechung von Serum*. Die fünf Schwangerenseren zeigen bezüglich der Brechungsverminderung als auch des Einflusses der Temperatur und der Differenz zwischen Kaolin und Kohle bereits ein verschiedenes Verhalten, dessen Wesen nicht nachgegangen wurde. Auch die Organpräparate dürften vermutlich verschiedene Zerteilung und Zusammensetzung besitzen, demgemäß könnte ihre Oberflächenwirkung und Adsorptionsfähigkeit verschieden stark sein, dasselbe gilt auch für die einzelnen Seren. Da der durch andere Faktoren bewirkte gegensätzliche Einfluß überwiegt, so ließen sich diese Verhältnisse, wie bereits erwähnt, nicht an Substraten prüfen. Es ist jedoch bei der groben Zerteilung der Präparate im Vergleich zu Kohle und Kaolin zu vermuten, daß die *durch Adsorption bedingte Fehlerquelle*, sollte sie zur Auswirkung gelangen, *nur gering* sein kann.

Tabelle VI.

Gravid.-Serum Nr.	24 Stdn. Aufbewahrung bei 37° C					24 Stdn. Aufbewahrung bei 8° C				
	Serum allein	Serum + Kaol.	T.T.	Serum + Kohle	T.T.	Serum allein	Serum + Kaol.	T.T.	Serum + Kohle	T.T.
1	1735	1720	− 15	1687	− 48	1736	1603	− 133	1620	− 116
2	1636	1516	− 120	1574	− 62	1632	1621	− 11	1594	− 38
3	1800	1677	− 123	1546	− 254	1785	1758	− 27	1736	− 49
4	1818	1799	− 19	1731	− 87	1809	1765	− 44	1800	− 9
5	1802	1781	− 21	1805	+ 3	1804	1748	− 56	1800	− 4

Es bedarf noch der Erwägung, inwieweit durch Substratanwesenheit Hemmungen frei werden, wodurch nach *Sachs* physikalisch-chemische Änderungen in Erscheinung treten, und ob, wie *Stephan* und *Wohl, Öller* und *Stephan* glauben, hierbei die antitryptische Wirkung des Serums gehemmt wird, so daß ein proteolytisches Serumferment seine Wirksamkeit entfalten und primäre Serumautolyse bewirken kann. *Serejski* versuchte den Einfluß des Serumferments zu analysieren, indem er mit aktivem und inaktivem Serum zugleich arbeitete. Jedoch konnte in seinen Versuchen die Inaktivierung nicht weit genug getrieben werden, da sich optische, die Methode störende Änderungen einstellten. Die Inaktivierung führt ebenso wie die Bebrütung zu einer Erhöhung des Brechungswertes (s. oben). *Plaut* fand nach Zusatz von Bolus und Kaolin an Stelle von Gewebssubstrat zu Serum Auftreten und Vermehrung ninhydrinreagierender Spaltprodukte. *Hormaesche* hat teilweise Vermehrung des inkoagulablen N bei aktiven Seren im Vergleich mit den entsprechenden inaktiven Seren nach Zusatz bestimmter, nach *Pregl* und *de Crinis* hergestellter Organpräparate konstatiert. Bei der Bestimmung des Rest-N bediente er sich einer neuen Methode von *Pincussen*, die *Fonseca* hinsichtlich ihrer Resultate geprüft hatte, während *de Anciaes* nachwies, daß bei der Enteiweißung des Serums, noch mehr bei gleichzeitiger Anwesenheit von Substraten, auch mit dieser Methode noch beträchtliche Mengen N-haltiger Produkte, vor allem Pepton, an das Koagulum adsorbiert werden können.

Von ausschlaggebender Bedeutung auf den Versuchsausfall schien im Gegensatz zu den bisher behandelten Faktoren die *Substratquellung* zu sein. Dies wird von *Hirsch* hinsichtlich der nach seiner Anweisung hergestellten Präparate bestritten. *Pregl* und *de Crinis* tragen der Quellung bei Anwendung der nach ihrem eigenen Verfahren hergestellten Präparate Rechnung. Ihre Fähigkeit zu quellen wurde für letztere auch von *Kupelwieser* aufgezeigt. *Hirsch* verlangt gerade die völlige Trockenheit seiner Präparate und ihre angebliche Quellunfähigkeit als Bedingung ihrer Brauchbarkeit. Die nach den Vorschriften von *Hirsch* hergestellten Präparate (Opzime „Pharmagans") werden in anderer Weise gewonnen und am Schluß der Behandlung mit Aceton gehärtet. Fällt schon bei bloßer Betrachtung die *Volumenzunahme des Pulvers* kurze Zeit nach Einbringung in Wasser, Kochsalz, Gummilösung usw. als auch Serum sehr deutlich auf, so kann die *Substratquellung* unter *Ausschluß einer einfachen Lösung oder Verdauung* interferometrisch *direkt nachgewiesen* werden.

Die Quellung ist abhängig von der Natur des quellenden Substrats und der Beschaffenheit des Quellungsmittels, in das es eingebracht wird. Enthält letzteres gelöste Stoffe, so werden diese nicht immer in gleicher Weise wie das Lösungsmittel (Wasser) in die Substrate eindringen, und folglich wird das Quellungsmittel konzentrierter werden. Das trifft gerade für das Serum zu, in dem kolloidale und kristalloide Stoffe reichlich anwesend sind. Die Erhöhung der Refraktion wird alsdann um so stärker sein, je größer die Brechkraft des Quellungsmittels und je höher die Differenz dieses gegenüber derjenigen Flüssigkeit, die den Körper aufquillt. Die Beschaffenheit des Quellungsmittels kann hinsichtlich seines Elektrolytgehalts, seiner Reaktion, seiner physikalischen Eigenschaften von Bedeutung sein, beim Serum z. B. vor allem Quellungsdruck, Art und Menge des Eiweißes. Während einige dieser Faktoren beim Serum relativ konstante Größen sind, unterliegt Menge, Zusammensetzung und Quellung (Hydratation) der Serumeiweißkörper größeren Schwankungen. An Hand des *Vergleichs von Viskosität, Eiweißgehalt und Brechungszunahme* unter Zusatz gleicher Mengen desselben Substrats wurde eine Orientierung hierüber erstrebt. Wie eine Anzahl von Versuchen (Tabelle *VII*) lehrt, bestand *kein* erkennbarer *Zusammenhang*, wofür einerseits die Unzulänglichkeit der Methoden, andererseits die Möglichkeit überdeckender, fermentativer Substratauflösung und endlich die Geringgradigkeit des in Betracht kommenden Effekts verantwortlich sein können.

Tabelle VII.

Serum I. W.	Proz. Eiweiß	Viscos. (*Hess*)	T. T.-Zunahme	Serum I. W.	Proz. Eiweiß	T. T.-Zunahme	Serum I. W.	Proz. Eiweiß	T. T.-Zunahme
1504	6,26	1,72	24	1528	6,38	29	1736	7,47	26
1522	6,36	1,55	14	1555	6,53	10	1747	7,53	23
1536	6,43	1,61	27	1578	6,64	11	1779	7,69	18
1602	6,77	1,72	5	1598	6,75	27	1788	7,75	29
1710	7,33	1,82	19	1612	6,82	29	1799	7,80	27
1768	7,64	1,84	25	1632	6,93	23	1830	7,97	16
1780	7,70	1,83	18	1637	6,96	31	1843	8,03	36
1801	7,82	1,84	20	1654	7,04	14	1856	8,10	27
1827	7,95	1,86	25	1697	7,26	18	1863	8,14	22
1835	7,99	1,84	22	1728	7,43	26	1896	8,26	28
1856	8,10	1,87	20	1730	7,44	13	1936	8,52	33
							1979	8,74	27

Der Nachweis der Substratquellung konnte nur unter Verwendung solcher *Quellungsmittel* mit Anspruch auf Beweiskraft geschehen, die *keinerlei fermentative Wirkung* entfalten, und die auch hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, optischen Dichte und kolloidalen Natur mit dem Serum einigermaßen übereinstimmen. Es war danach zu erwarten, daß Quellung der Substrate in destilliertem Wasser den I. W. nicht verändern (erhöhen!) durfte, wenn nicht spontane Löslichkeit der Substrate eintrat. Nahezu das gleiche gilt wegen ihrer geringen Brechung von physiologischer NaCl-Lösung, wenn selbst hier Wasser- und Salzionen ungleich stark diffundieren konnten, was aber nur bei konzentrierten Salzlösungen deutlich positive Ausschläge verursachen kann. Tabelle VIII zeigt unter Anwendung verschiedener kolloidaler und Eiweißlösungen den beträchtlichen Einfluß der Substratquellung auf den Brechungsindex bei Prüfung verschiedener Substrate. Die festgestellten Erhöhungen stimmen mit denen der Tabelle V im Prinzip überein.

Tabelle VIII.

	I. W. der Lösung	Kontrolle	Placenta	Ovarium	Testis	Lunge normal	Lunge tbc.	Leber	Milz	Tbc.-Bazillen
NaCl 0,9proz.	164	0	—	4,5	—	—	4,5	4	—	4,5
NaCl 10 „	1774	0,5	13	4,5	—	−2,5	—	4	—	4,5
NaCl 0,92 „ NaOH 0,2 „ $NaHCO_3$ 0,02 „	212	0	—	—	—	21	—	—	16	—
NaCl 0,8 „ $NaHCO_3$ 0,02 „	168	1	13	—	—	—	—	—	—	5
Casein 4,5 „	919	0	20	16	11	19	14	8	17	18
„ 8 „	1695	0	35	34	17	14	20	—	15	—
Albumin 4 „	717	1	—	16	—	20	—	—	19	—
Gummi 20 „	2733	−4,5	31	13	5	35	13	4,5	26	8
Gelatine 10 „	2250	−4	16	—	6	—	—	8	14	—
Kleber 0,5 „	88	0	0	—	—	—	—	2	—	—
Carraghen ca. 2 „	341	1	10	—	—	—	—	—	—	—

Im Fortgang der Untersuchung *mußte* die *Quellung berücksichtigt* und ein geeignetes Verfahren gesucht werden, mit dem *Zeitpunkt und Stärke ihres Einflusses auf den Brechungswert* zu bestimmen und dieser von der Versuchsanordnung auszuschließen war. Das Verfahren von *Pregl* und *de Crinis* erwies sich hierzu wenig geeignet. Bei diesem wird das Organpulver mit heißer physiologischer Kochsalzlösung übergossen und 10 Minuten später nach erfolgter Quellung möglichst weitgehend abgesaugt, wobei ein Rest zurückbleiben muß. Dabei tritt eine Serumverdünnung ein, die eine Differenzmessung gegen das unvorbehandelte und unveränderte Serum nicht mehr erlaubt; außerdem wird mit diesem Verfahren auch ein neuer, in seiner Wirkung unbekannter, quantitativ nicht abstufbarer Faktor eingeführt.

Ich wählte deswegen folgende einfache Methode: Zu 0,005 g Substrat wird die doppelte Menge, also 1 ccm Serum, in etwas größere, 1,2 ccm fassende Röhrchen gegeben, diese mit Gummikappen wie oben verschlossen und in einem kleinen Stativ in einer Kältemischung so untergebracht, daß die Wände der Versuchsröhrchen allseitig mit ihr in steter Berührung bleiben, um eine beginnende Fermentwirkung hintanzuhalten. Wiederholt wird gut umgeschüttelt, nach einer zur Beendigung der Quellung ausreichenden Zeit (2 Stunden) wird erneut gut durchgemischt, bis zum Absetzen der Substratteilchen scharf zentrifugiert und vom überstehenden klaren Serum zweimal je 0,25 ccm in entsprechende kleinere Röhrchen zur weiteren 24stündigen Aufbewahrung bei 37° und 8° C angesetzt. Auch hier läuft eine Eisschrankkontrolle mit, um bakterielle Zersetzungen bei dem jetzt technisch etwas erschwerten Verfahren richtig erkennen zu können. Der übrige Versuchsgang verläuft wie früher. Der Quellungsbetrag ist nunmehr bei Verwendung der doppelten Menge Serum geringer, die Quellung von 5 mg Substrat im größeren Quellungsmittel dafür erleichtert. Es besteht kein Hindernis, statt 1 ccm auch 1,5 ccm anzuwenden und 0,5 ccm in zwei Gläschen zu überführen. Bei der im folgenden untersuchten Quellungszeit war das nicht empfehlenswert, weil bei dem Studium des Quellungseffektes auf die Brechung *starke Ausschläge erwünscht* waren.

Das *Optimum der Quellungszeit* kann derart untersucht werden, daß in bestimmten Zeitabständen von den wie beschrieben angesetzten Proben kleine Mengen entnommen und außerhalb der Einwirkung des Substrats wie das Substratserumgemisch in Gläschen gut verschlossen aufbewahrt werden. Aus praktischen Gründen konnten jedoch nur drei Bestimmungen in dieser Weise gemacht werden, da die Menge von 1 ccm nicht weiter ausreichte; damit konnte aber auch der Zeitpunkt der beendigten Quellung nur annäherungsweise ermittelt werden. Zur Kontrolle liefen zwei Serumproben mit, die nicht der Substratquellung ausgesetzt waren, aber sonst ebenso, auch in der Kältemischung, behandelt worden waren. Eine dieser beiden Kontrollen kam mit dem Serumsubstrat (Restserum und Substrat) und den nach 2, 4 und 6 Stunden der Serumsubstratquellung ausgesetzten Serumproben 24 Stunden in den Thermostaten, die zweite Kontrolle gleich lange in den Eisschrank. Bei dieser Art der Versuchsanordnung konnte, wie Tabelle IX deutlich erkennen läßt, eine stattgehabte *Substratquellung nach Ablauf von 2 Stunden* erschlossen werden, da in weiteren 2 Stunden eine Änderung nicht mehr auftrat. Dann allerdings nimmt der Brechungswert bis zur sechsten Stunde wieder zu, vermutlich infolge des Beginns einer zwischen Substrat und Serum verlaufenden Reaktion, von der noch dahingestellt sei, welcher Natur sie ist. Etwas anders verhalten sich die Modelllösungen, bei denen infolge Substratquellung auch nennenswerte, von der Konzentration abhängige Dichtezunahmen eintreten, die bei Bebrütung allerdings teilweise wieder abgeschwächt werden, wobei man zunächst an Adsorptionswirkung der Substrate oder Stärkerwerden der Hydrophilie der Kolloide bei höherer Temperatur zu denken

geneigt ist. Der effektive Brechungszuwachs ist in Reihe 8 der Tabelle auf die im Originalverfahren zur Anwendung gelangten Mengenverhältnisse von Organ und Serum der Einfachheit halber linear berechnet.

Tabelle IX.

	T. T.-Zunahme bei	Gravidenseren				Gummi 20 Proz.	Casein 4,5 Proz.	Albumin 4 Proz.	Kleber 0,5 Proz.
		1	2	3	4				
1.	24 Stdn. Aufbewahrung im Eisschrank . .	0	0	0	0	0	0	0	0
2.	24 Stdn. Aufbewahrung im Brutschrank . .	0	—	2	—	4,5	0	7	4,5
3.	2 Stdn. Quellung von Placenta, dann wie 2	16	4	14	17	54	9	16	6
4.	4 Stdn. Quellung von Placenta, dann wie 2	15	4	14	10	—	—	—	—
5.	6 Stdn. Quellung von Placenta, dann wie 2	20	7	17	25	—	—	—	—
6.	24 Stdn. Placentaeinwirkung im Brutschrank nach 6stündiger Substratquellg.	43	41	36	62	—	—	—	—
	nach 2stündig. Substratquellung . . .	—	—	—	—	40	2	11	0
7.	Nicht durch Quellung bedingte T. T.-Zunahme 6 minus 5 .	23	34	19	37	0	0	0	0
8.	Auf 0,005 Placenta und 0,5 Serum berechnet	11,5	17	9,5	18,5	0	0	0	0
9.	6 Stdn. Quellung durch Lebersubstrat . . .	11	20	20	15	—	—	—	—
10.	6 Stdn. Quellung durch Tesikal	22	—	—	—	—	—	—	—
11.	6 Stdn. Quellung durch Ovar	22	—	—	—	—	—	—	—

Der weitere Fortgang der Untersuchung bewegte sich in rein empirisch-analytischer Weise. Es war nach Ausschaltung der genannten, in Betracht kommenden Fehlerquellen die Frage nach der Natur dieser Reaktion zu entscheiden, ohne daß irgendwelche Voraussetzungen hinsichtlich des zwischen Substrat und Serum unter besagten Versuchsbedingungen ablaufenden, in Gestalt einer Zunahme der Brechung erkennbaren Prozesses gemacht wurden. Von der für die interferometrische Analyse günstigen Wahl des makroheterogenen Systems und von der interferometrischen Methode allein konnte eine Auskunft hierüber nicht erwartet werden. An Hand eines *diagnostisch gesicherten Materials* konnte lediglich der *Beziehung zwischen Krankheitsprozeß und Reaktionsausfall* im Hinblick auf das Vorhandensein einer gegebenenfalls zur Regel zu erhebenden Übereinstimmung nachgegangen werden.

Tabelle X zeigt den Ausfall der in beschriebener Weise ausgeführten Reaktion nach Ausschaltung der Substratquellung. Sera von *Graviden* im fünften bis zehnten Lunarmonat zeigen überwiegend einen *stärkeren*

Tabelle X.

T. T.-Zunahme nach 3 Stunden Substratquellung und 24 Stunden Brutschrankaufenthalt.

Organsubstrat	Gravide													Mittel	Gesunde							Mittel
															Diabetes	Cystitis	Diphtherie	Vergiftung				
Placenta . .	—	—	24	24	36	15	9	14	18	19	17	25	26	20,8	4	—	9	—	7	11	10	10	8	8,4
Ovar . . .	33	20	45	20	11	—	—	—	—	—	—	—	—	25,8	—	10	9	—	9	—	12	12	—	10,4
Testis . . .	9	2	18	14	18	—	—	—	—	—	—	—	—	12,2	2	—	—	0	9	8	10	11	8	6,7

Ausfall als Gesunde und innere Kranke beiderlei Geschlechts, sowohl bei Verwendung von Placenta als auch Ovarium, während mit Testikelsubstanz die T. T.-Zunahme bei den Schwangeren wechselt. Leider wurde hierbei nicht verfolgt, welches Knabenschwangerschaften waren. Bei *offenen, reaktionstüchtigen Lungentuberkulosen* fand sich im *Vergleich mit klinisch Gesunden und anderen Krankheiten kein Unterschied* (Tabelle XI). Abgesehen von der numerischen Beschränkung der Versuche in Tabelle X könnte man geneigt sein, ihre Resultate als positiven Ausfall zu werten. Um ihre Natur und ihr Zustandekommen zu studieren, empfahl sich, statt des makro-heterogenen (Serum + koaguliertes Protein), das mikroheterogene System (Serum + gelöstes Protein).

Tabelle XI.

T. T.-Zunahme nach 3 Stunden Substratquellung und 24 Stunden Brutschrankaufenthalt.

Organsubstrat	Sichere Tuberkulose																				Gesamtmittel
	Offene, leicht progradiente und fieberhafte reaktionskräftige Lappenaffektionen																				
	Männer													Frauen							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Mittel	1	2	3	4	5	6	Mittel	
Lunge, normal .	22	26	16	38	26	9	18	24	28	15	27	25	22,8	—	25	27	—	15	30	24,2	23,1
„ tbc. . . .	9	28	10	24	—	18	22	16	19	16	23	6	17,4	22	16	24	7	18	10	24,2	19,7
Lymphdrüse, tbc.	16	21	8	28	22	2	10	1	13	14	11	16	13,5	—	17	—	12	17	14	14,7	13,8
Tbc.-Bazillen . .	16	34	—	5	15	5	4	16	24	19	15	20	15,7	15	10	11	—	12	21	13,8	14,5
Milz, normal . .	—	—	—	—	33	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Leber, „ . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Organsubstrat	Tuberkulose nicht nachweisbar															Gesamtmittel
	Grippe	Ikterus	Carcin.	Arthritis	Klinisch Gesunde											
	Männer						Frauen									
	1	2	3	4	5	Mittel	1	2	3	4	5	6	Mittel	
Lunge, normal .	—	—	—	—	—	—	—	8	24	35	23	14	20,8	20,8
„ tbc. . . .	14	15	14	15	0	11,6	16	—	14	16	18	21	17	14,3
Lymphdrüse, tbc.	39	17	15	20	16	21,4	17	11	15	—	4	1	9,6	16,5
Tbc.-Bazillen . .	27	19	14	25	16	20,2	22	28	10	—	17	6	16,6	18,4
Milz, normal . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Leber, „ . .	15	23	20	12	3	14,6	—	—	—	—	—	—	—	

2. Im mikro-heterogenen System.

Die Einführung des mikro-heterogenen Systems gestattete die Ausschaltung von spontaner oder durch Peptisation bedingter Substratlösung und die hierdurch erzielten Brechungsänderungen. Um die Natur nun noch zur Beobachtung gelangender Brechungsänderungen näher kennenzulernen, wurde als direkte Methode das Alkoholverfahren von *Lüttge* und *v. Mertz* herangezogen, mit dem durch den Nachweis von Abbauprodukten die Proteolyse eines im System anwesenden Eiweißes erschlossen werden konnte. Ergaben sich zwischen beiden Verfahren weitgehend übereinstimmende, hinsichtlich der Änderung des Brechungsindexes nur in einer Richtung determinierte Ausschläge, so war ein Zusammenhang beider Erscheinungen und ihre Deutbarkeit aus der Eiweißaufspaltung als relativ gesichert anzunehmen. Anderweitige, durch die physikalisch-chemische Strukturänderung bedingte Brechungsänderungen konnten demnach nur nebensächlicher Bedeutung sein und waren am ehesten durch quantitative Verfolgung der entstehenden Abbauprodukte und zugehörigen Refraktionsänderung zu erfassen. Aus Zweckmäßigkeitsgründen wurde zunächst die Beziehung beider Vorgänge am Schulbeispiel der gegenseitigen Einwirkung von Serum Gesunder, innerer Kranker und Schwangerer auf Placentareiweißlösung geprüft, gleichzeitig aber auch auf andere Eiweißlösungen.

Die Gewinnung der Lösungen geschah in folgender Weise:

Eine frisch geborene Placenta wurde sofort entblutet, von den Nabelschnurgefäßen aus mit Wasser, Kochsalz und $^1/_8$proz. Essigsäure durchspült, von den Häuten und dem Bindegewebe weitmöglichst befreit, fein zerkleinert, alsdann erneut in gleicher Weise mehrfach gewaschen und koliert. Mit Benzidinprobe und Ninhydrinreaktion waren weder Hämoglobin noch Abbauprodukte nachweisbar. Das zerkleinerte Gewebe wurde alsdann in n/10 NaOH zur Lösung gebracht, mit $NaHCO_3$ und $NaOOCCH_3$ gepuffert, nach erfolgter Substratlösung mit n/10 HCl so weit neutralisiert, daß das Gemisch nur eine Spur alkalisch blieb. Nach Filtration durch ein Berkefeldfilter erwies sich die Lösung als bakteriologisch keimfrei, war durchsichtig klar und hatte eine gelbliche Serumfarbe. Nach *Kjeldahl* enthielt sie 0,319 g-Proz. N = 1,79 Proz. Eiweiß, war leicht hypertonisch, entsprechend einer Kochsalzlösung von 1,2 Proz. Die Verwendung des möglichst noch nativen Placentaeiweißes mit einem Rest noch enthaltenen Bindegewebes, Lipoide und anderer Zellbausteine schien tunlicher als stärkere Vorbehandlung, mehrfache Umfällung, Lipoidextraktion, durch welche die Wirksamkeit der Präparate verändert werden konnte. Lipoide und Extraktstoffe konnten andererseits für das eventuelle Zustandekommen der Reaktion von Wichtigkeit sein.

In ähnlicher Weise wurden auch die übrigen Eiweißlösungen hergestellt. Als Ausgangsmaterial dienten Casein, Ovalbumin, Serumalbumin und Globulin, Kleber (von *Kahlbaum*, *Grübler* oder *Merck*), die in physiologischer Kochsalzlösung bzw. n/10 NaOH gelöst und mit n/10 HCl bis auf Spur Alkaleszenz neutralisiert wurden. Als Puffer diente auch hier 0,2proz. $NaHCO_3$ und 0,2proz. $NaOOCCH_3$. Novoprotin (wahrscheinlich 0,5proz. Kleber) und Caseosan (= 4,5 proz. Casein) wurden in Gestalt der bekannten

Fabrikpräparate zusatzlos mit verwandt. Eierklar wurde aus frischen Eiern gewonnen, verflüssigt, durch Bakterienfilter gesaugt und ebenfalls mit Puffer versetzt. Sämtliche Lösungen wurden hinsichtlich Keimfreiheit geprüft.

Die Versuche wurden folgendermaßen angesetzt: Je 0,5 ccm der Placentar- als auch der übrigen Lösungen wurden mit 0,5 ccm verschiedener Seren vermischt, nach 10 Minuten und nach 24stündiger Einwirkung im Thermostat und Eisschrank interferometrisch bestimmt. Das Alkoholverfahren[1]) wurde mit 0,5 ccm des Reaktionsgemisches angestellt, nach Zusatz von 5 ccm 96proz. Alkohols gekocht, filtriert und mit 0,1 und 0,2 ccm einer 1proz. Ninhydrinlösung die Ninhydrinprobe qualitativ ausgeführt, ihr Ausfall schätzungsweise durch Zeichen notiert.

Den Ausfall dieser Versuche zeigen Tabelle XII und XIII. *Schwangerensera mit Placentaeiweiß* zeigen größtenteils beträchtliche *Refraktionserhöhung*, zu einem kleineren Teile jedoch keine Veränderung bzw. geringe Erniedrigung. Die Ninhydrinprobe ist *zumeist*, jedoch unabhängig vom Ausschlag der Brechungsexponenten, *stark positiv*. Bei den Seris von *Gesunden* als auch *inneren Kranken* dagegen *fehlt die*

Tabelle XII.

Art des Serums 0,5 ccm	Art des Zusatzes 0,5 ccm	I.W. des Gemisches vorher	I. W. nach 24 Stdn. Aufbewahrung 37°	I. W. nach 24 Stdn. Aufbewahrung 8°	Zunahme T. T.	Alkoholverf.*) (Ninhydrinprobe) 37°	Alkoholverf.*) (Ninhydrinprobe) 8°	Bemerkung
—	2 proz. Placentarlösung	535	535	536	— 1	Sp?	—	
Gravida**) . .	„	1151	1138	1146	— 8	++	Sp?	
„ . . .	„	1170	1235	1172	+ 63	++	Sp	
„ . . .	„	1138	1142	1142	± 0	++	Sp?	
„ . . .	„	1182	1195	1181	+ 14	+	±	
„ . . .	„	1045	1108	1044	+ 64	++	Sp?	
„ . . .	„	1040	1168	1038	+ 70	++	+	
„ . . .	„	1195	1272	1195	+ 77	—	—	
„ . . .	„	1156	1170		(+ 14)	—		
„ . . .	„	1158	1148		(— 10)	+	—.	Serum leicht hämolyt.
Gesund	„	1203	1205	1204	+ 1	—	—	
Sumbajo . . .	„	1216	1222		(+ 6)	—	—	
Cholecystitis .	„	1148	1148		(± 0)	—	—	Serum ikterisch
Myodeg. cordis	„	1112	1106		(— 6)	—	—	
Huntington chora . . .	„	1253	1253	1252	+ 1	Sp	—	Serum leicht hämolyt.
Ikterus cath. (abgel.) . .	„	1218	1220		(+ 2)	+	—	Serum ikterisch

*) Nynhydrinreaktion: Reihenfolge des Ausfalls —, Sp?, Sp, ±, +, ++.
**) Gravide der letzten Monate VI—X. — Sera allein sämtlich negativ vorher und nachher 37° u. 8° C

[1]) Genaue Einzelheiten über das Alkoholverfahren und die Ninhydrinprobe s. Literatur bei *Sellheim, Lüttge* und *v. Merz, Oppler, Löhner*. Die quantitative Bestimmung der Abbauprodukte wäre bei dem Umfange dieser Versuche nicht durchführbar gewesen. Die qualitative Probe zeigt jedoch bereits die häufig entgegengesetzte Richtung im Ausfall der direkten und indirekten Methode.

Tabelle XIII.

Art des Serums	Art des Zusatzes**)	I.W. des Gemisches vorher	I.W. nach 24 Stdn. Aufbewahrung		Zunahme T.T.	Alkoholverfahren (Ninhydrinprobe)	
0,5 ccm	0,5 ccm		37°	8°		37°	8°
1. Gravida*) .	Casein . . .	1860	1877	1858	+ 19	++	++
	Ovalbumin .	1550	1562	1555	+ 7	+	±
	Plac. I . . .	1145	1153	1145	+ 8	+	+
	„ II . .	1169	1169	1169	± 0	+	+
	„ III . .	1171	1170	1167	+ 3	Sp	Sp
2. Gravida*) .	Serumalb. .	1826	1845		(+ 19)	Sp?	
	Serumglob. .	1631	1638	1631	+ 7	+	+
	Plac. I . . .	1126	1134	1126	+ 8	++	+
	„ II . .	1137	1144	1136	+ 8	±	±
	„ III . .	1140	1140	1140	± 0	±	±
3. Gravida*) .	Plac. I . . .	1175	1180		(+ 5)		
	„ II . .	1152	1158		(+ 6)		
	„ III . .	1166	1166		(± 0)		
4. Gravida*) .	Kleber . . .	1348	1354	1354	± 0	—	—
	Eierklar . .	1152	1158	1150	+ 8	—	—
	Plac. I . . .	1172	1178	1159	+ 19	+	Sp
	„ II . .	1195	1172	1132	+ 40!	±	±
	„ III . .	1211	1174	1155	+ 19	Sp	Sp?
5. Gravida . .	Novoprot. .	924	925		(+ 1)	Sp?	Sp?
	Serumglob. .	1639	1657	1656	+ 1	+++	+
	Caseosan . .	1975	2004	1846		++++	++++
	Plac. I . . .	1143	1137	1138	— 1	++	±
6. Gravida . .	Caseosan . .	1403	1401	1403	— 2	++	±
	Ovalbumin .	1643	1640	1620	+ 20	±	Sp?
	Casein . . .	1928	1926	1923	+ 3	+++	+++
	Plac. I . . .		1188	1172	+ 16	++	+
7. Gesund . .	Casein . . .	1841	1844	1842	+ 2	++++	+
	Serumalb. .	1875	1878	1874	+ 4	+	++
	Plac. I . . .	1182	1178	1184	— 6	+	Sp
8. Gesund . .	Plac. I . . .	1131	1129	1132	— 3	+	+
9. Gesund . .	Plac. I . . .	1125	1122	1129	— 7	±	±

*) Sera allein im Alkoholverfahren vorher und nachher 37° u. 8° C negativ.
**) Nähere Erläuterungen über die Zusätze in Tab. 15.

Brechungserhöhung oder ist gering, die Ninhydrinreaktion ist zumeist negativ oder nur schwach positiv. Die zusatzlosen Seren als Kontrolle zeigten keine optische, oberhalb der sonst gefundenen Grenzen (s. oben) liegenden Änderung, noch die Bildung ninhydrinnachweisbarer Abbaustoffe an.

Bei sechs Graviden- und drei Gesundenseren wurden neben drei verschiedenen Placentarlösungen auch die obengenannten *Eiweißlösungen als Zusatz* verwandt. Placentarlösung I erthielt 0,5, II 1,0 und III 2,0 Proz. Phenol zur Gewährleistung der Sterilität bei länger dauernder Aufbewahrung. Aus den wenigen Versuchen geht bereits hervor, daß mit wachsendem

Phenolzusatz die *Ausschläge des Interferometers* und die *Stärke des Alkoholverfahrens abnehmen*, in Übereinstimmung mit Angaben von *Abderhalden*, der eine Abschwächung von Fermentreaktionen durch Phenolzusatz beobachtete. Es soll jedoch nicht untersucht werden, inwieweit und ob der Carbolzusatz eine Stabilisierung begünstigt oder die zwischen Serum und Substratlösung ablaufende Reaktion hemmt bzw. schwächt. Ein Zusatz von *0,5 Proz. Phenol* war *nicht nachteilig*, das Präparat I zeigt auch heute noch, nach mehr als einem Jahre, keinerlei Verunreinigung und Infektion, ist völlig klar, nur eine Spur Eiweiß ist am Boden des Gefäßes sedimentiert.

Von Bedeutung ist die Feststellung (Tabelle XIII), daß *auch bei Ersatz des Placentareiweißes durch andere Proteine Brechungserhöhung und* Auftreten ninhydrinnachweisbarer *Spaltprodukte* beobachtet werden konnten, bei *Schwangerenseris* jedoch in *stärkerem* Maße als bei Gesunden. Da in diesen Versuchen die interferometrische Methode als auch das Alkoholverfahren Übereinstimmung vermissen ließen, ja sogar gelegentlich voneinander unabhängige Ausschläge gaben, so erscheint bewiesen, daß *Refraktionserhöhung und Eiweißabbau nicht koordinierte Vorgänge* zu sein brauchen, und daß Refraktionserhöhungen nicht einmal im mikro-heterogenen System einen sicheren Schluß auf fermentativen Eiweißabbau, noch weniger auf dessen Spezifität zulassen. Die Versuche mit anderweitigen Proteinlösungen, die mit Schwangerenseren in gleicher Weise wie die Placentarlösung reagierten, schließen geradezu die Annahme einer Spezifität aus.

Die weitere Analyse zielte auf Feststellung, welcher Art die Brechungserhöhung und welcher Natur die zu Abbauprodukten führende Proteinspaltung sei. Beide Vorgänge brauchten nicht notwendig Ausdruck eines fermentativen Prozesses zu bilden. Die Refraktionszunahme konnte sowohl durch physikalische und chemische Strukturänderungen im Gemisch mit einem über mehrere Stunden sich hinziehenden Ablauf, konnte auch durch Autolyse einer von beiden Mischungskomponenten zustande kommen, wobei die Vermischung zweier heterogener Proteinlösungen als auslösender Faktor in Betracht zu ziehen war. Die gebildeten Abbauprodukte wären alsdann als Endprodukte dieses autolytischen Vorgangs bzw. des spontanen, durch Zusatz begünstigten Eiweißzerfalls einer oder beider im Reaktionsgemisch vereinigter Eiweißlösungen anzusprechen. Die primäre Wirksamkeit von Fermenten war hierzu durchaus nicht absolut notwendig. Im Serum vorhandene Fermente konnten nämlich durch den Zusatz von Placentar- und den übrigen Eiweißlösungen, wie betont durch Beseitigung von Hemmungen (Antifermente) befähigt werden, Eiweiß zu spalten. Falls aber die Brechungsveränderung ein Kennzeichen dieses Vorgangs war, konnte erwartet werden, daß bei den verschiedenen Formen der Eiweißverdauung (tryptischer und peptischer) verschiedener zur Verwendung gelangten Eiweißkörper ein ähnliches Resultat sich reproduzieren ließ.

Die oben genannten Eiweißlösungen wurden mit auf Wirksamkeit geprüften Fermentlösungen im Halbzusatz zersetzt, unter Innehaltung der früher gegebenen Vorschriften. Als Ferment gelangte zur Anwendung 0,2 Proz. Trypsin siccum (*Grübler*) in n/30 NaOH, 2 Proz.

Trypsinglycerinlösung in n/30 NaOH und 0,2 Proz. Pepsin siccum (*Grübler*) in n/30 HCl gelöst. Auf die optimale p_H und Fermentkonzentration konnte bei dem Umfang der Versuche nicht geachtet werden, welche Faktoren bei dem rein qualitativen Nachweis zunächst auch außer acht bleiben konnten. Die Resultate in Tabelle XIV zeigen nun, daß ein gesetzmäßiges Verhalten zwischen dem Ausfall der Ninhydrinreaktion als Maßstab für die Menge der gebildeten Abbaustoffe und der Refraktionsänderung nicht besteht, daß sich sogar für verschiedene Eiweißlösungen ein völlig differentes Bild auch in bezug auf peptische und proteolytische Spaltung ergibt. So ist bemerkenswert, daß die tryptische Verdauung von Serumalbumin beträchtliche Refraktionsabnahme, bei Serumglobulin jedoch Erhöhung bewirkt. Zwischen Trypsin siccum und Trypsinglycerin bestehen quantitative Differenzen zu Lasten des letzteren, wobei sich die Richtung der stattgehabten Änderungen bei beiden gleichsinnig, zumeist in Zunahme ausdrückt, während bei Pepsin überwiegend Abnahme resultiert, besonders wenn man die spontane Zunahme der Pepsinlösung, deren Ursache nicht erkannt wurde, mit halbem Wert in Rechnung bringt und abzieht.

Die Refraktionsänderung von Eiweißlösungen durch Zusatz schwacher Säuren oder Basen, die auch von *Dörr* und *Berger* festgestellt wurden, hat auf den Ausfall unserer Versuche keinen Einfluß mehr. Bereits bei der Bestimmung „vorher", d. h. 10 Minuten nach erfolgter Mischung, war diese Refraktionsabnahme ausgeglichen. Trat bei der Mischung ein leichter Niederschlag oder Trübung ein, so wurde bis zum Klarwerden des Gemisches zentrifugiert.

Die *Refraktionsdepression* durch *Säure- oder Alkalizusatz* ist von bemerkenswerter Stärke (Tabelle XV). Sie ist durch chemische Umsetzung, Salzverbindungen des Eiweißes usw. bedingt, die, wie oben betont, von stärkerem Einfluß auf die optische Dichte sind, als Dispersitätsänderungen. Aus den Abweichungen vom Mischungsgesetz kann diese Depression quantitativ leicht bestimmt werden, da diese Regel für Mischungen ohne chemische Umsetzung additives Verhalten zugrunde legt. Die chemischen Umsetzungen bei Zusatz von Säuren und Basen waren auch optisch durch leichte Farbveränderung der Sera erkennbar, bei n/10 HCl weit stärker als bei n/10 NaOH und von einem weitgehenden Parallelismus. Nur in einem Falle lag eine Streifenverwechslung vor, welche durch die zweite Messung aufgeklärt wurde (Placenta + NaOH); ob dies auch für Serum 4 + NaOH zutrifft, konnte nachträglich nicht eruiert werden, da in blindem Verfahren, Berechnung nach Abschluß der Versuche, gearbeitet wurde. Es ist wahrscheinlich, daß dadurch der Differenzwert niedriger liegt. Die weitere einstündige Aufbewahrung bei 37° C und darauf folgender

Tabelle XIV.

Art der Lösung	Ohne Zusatz				Zusatz von 0,5 ccm Trypsin sicc. *Grübler*						Zusatz von 0,5 ccm Trypsinglycerin *Grübler*					
	vorher		nach 24 Stdn. bei 37°		vorher		nach 24 Stdn.				vorher		nach 24 Stdn.			
							bei 37°		bei 8°				bei 37°		bei 8°	
0,5 ccm	I. W.	Ninh.	I. W.	Ninh.	I. W.	Ninh.	I. W.	Ninh.	I. W.	Ninh.	I. W.	Ninh.	I. W.	Ninh.	I. W.	Ninh.
1. Casein 16 Proz.	1894	—	1902	—	1521		1552	++	1527	++	1441		1450	++	1442	+
2. Ovalbumin 10 „	1455	—	1461	—	1240		1245	+++	1245	+	1154		1162	++	1158	+
3. Serumalb. 10 „	1855	—	1859	—	1607		1556	+++	1460	+	1450		1426	++	1402	+
4. Serumglob. 7,5 „	1542	—	1541	—	1298		1309	++	1300	++	1201		1207	++	1203	++
5. Kleber 5 „	1163	—	1167	—	1035		1045	+	1033	+	925		928	+	925	+
6. Novoprotin 0,5 „	251	—	951	—	394		397	±	396	Sp	262		262	±	266	Sp
7. Caseosan 4,5 „	983	+	986	+++	927		949	++++	948	++++	822		833	++++	824	++++
8. Eierklar 3 „	812	—	812	—	818		819	±	820	±	683		684	Sp	684	Sp
9. Placenta I 2 „	588	—	584	—	640		647	+	640	+	532		532	±	532	Sp
10. „ II 2 „	603	—	600	—	653		652	+	654	+	545		543	±	546	Sp
11. „ III 2 „	657	—	654	—	716		708	±	723	±	604		592	±	604	Sp
12. Kontrolle (= Zusatz allein)					806		804	—	806	—	440		440	—	440	—

Art der Lösung	Zusatz von 0,5 ccm Pepsin *Grübler*						T. T.-Änderungen bei					
	vorher		nach 24 Stdn.				Trypsin sicc.		Trypsinglyc.		Pepsin	
			bei 37°		bei 8°							
0,5 ccm	I. W.	Ninh.	I. W.	Ninh.	I. W.	Ninh.	37°	8°	37°	8°	37°	8°
1. Casein 16 Proz.	1568		1577	+++	1568	++	+ 31	+ 6	+ 9	+ 1	+ 9	0
2. Ovalbumin 10 „	1242		1247	+++	1243	±	+ 5	+ 5	+ 8	+ 4	+ 5	+ 1
3. Serumalb. 10 „	1527		1527	—	1527	—	— 51	— 147	— 24	— 48	0	0
4. Serumglob. 7,5 „	1311		1316	++	1312	+	+ 11	+ 2	+ 6	+ 2	+ 5	+ 1
5. Kleber 5 „	1038		1049	—	1034	—	+ 11	— 2	+ 3	0	— 11	— 4
6. Novoprotin 0,5 „	416		418	—	419	—	+ 3	+ 2	0	+ 4	+ 2	+ 3
7. Caseosan 4,5 „	665		654	+	650	+	+ 22	+ 21	+ 11	+ 2	— 9	— 15
8. Eierklar 3 „	774		772	++++	773	+	+ 1	+ 2	+ 1	+ 1	— 2	— 1
9. Placenta I 2 „	645		604	++	605	+	+ 7	0	0	0	— 41	— 40
10. „ II 2 „	615		617	++	616	+	— 1	+ 1	— 2	+ 1	+ 2	+ 1
11. „ III 2 „	674		676	+	674	+	— 8	+ 7	— 6	0	+ 2	1
12. Kontrolle	783		793	—	786	—	— 2	0	0	0	+ 10	+ 3

Tabelle XV.

I. W. bei Mischung gleicher Teile von	—	n/10 NaOH					n/10 HCl					Bemerkungen
		berechnet	ermittelt nach		Diff.*) nach		berechnet	ermittelt nach		Diff.*) nach		
			10 Min.	4 Stdn.	10 Min.	4 Stdn.		10 Min.	4 Stdn.	10 Min.	4 Stdn.	
Serum I	1631	876	837	834	— 39	— 42	874	809	808	— 65	— 66	Gesund
„ II	1648	884	849	848	— 35	— 36	882	821	819	— 61	— 63	„
„ III	1591	856	820	817	— 36	— 39	854	779	781	— 75	— 73	Hypertonie
„ IV	1674	897	881	880	— 16	— 17	895	821	822	— 74	— 73	Nephrosklerose
„ V	1642	881	850	850	— 31	— 31	879	827	826	— 52	— 53	Arteriosklerose
10 Proz. Gummi . . .	1295	708	655	654	— 53	— 54	706	631	630	— 75	— 76	Hämolyse!
5 „ Gelatine . . .	1316	718	677	677	— 41	— 41	716	656	655	— 60	— 61	
2 „ Placenta I . .	717	419	436	414	+ 17	— 5	—	Ausfällung		—	—	436 Streifenverwechslung? — 22 = 414
10 „ Casein	1744	932	890	889	— 42	— 43	—	Ausfällung		—	—	
—	—	—	120	—	—	—	—	117	—	—	—	

Tabelle XVI.

I. W. bei Mischung gleicher Teile von	—	0,9 proz. NaCl + 0,2 proz. $NaHCO_3$					0,9 proz. NaCl + 0,2 proz. $NaOOCCH_3$					Bemerkungen
		berechnet	ermittelt nach		Diff.*) nach		berechnet	ermittelt nach		Diff.*) nach		
			10 Min.	4 Stdn.	10 Min.	4 Stdn.		10 Min.	4 Stdn.	10 Min.	4 Stdn.	
Serum normal ♂ . . .	1646	—	—	—	—	—	910	916	914	+ 6	+ 4	
„ „ ♀ . . .	1631	912	872	873	— 40	— 39	902	863	860	— 39	— 42	
„ Grav. m. VIII . . .	1590	892	865	865	— 27	— 27	882	848	845	— 34	— 37	
„ „ „ VII–VIII + Lues .	1641	917	891	—	— 26	—	907	881	879	— 26	— 28	
Casein 10 Proz.	1744	969	939	939	— 30	— 30	959	932	932	— 27	— 27	
Placenta 2 Proz. . . .	717	455	448	448	— 7	— 7	445	468	466	+ 23	+ 21	
—	—	—	194	—	—	—	—	174	—	—	—	

*) Vom additiv zu folgernden Wert, wenn keine Umsetzung vorhanden wäre.

dreistündiger Aufenthalt bei Zimmertemperatur von 20 bis 20,5° C haben keinen weiteren Einfluß auf die Brechung. Die Änderung von maximal 3 T. T. (bei zwei Bestimmungen) liegt nur 1 T. T. oberhalb des Maximalfehlers von ± 1 T. T. (s. Abschnitt I). Der Zusatz von Säuren und Alkalien führt demnach bereits vor Ablauf von 10 Minuten zum optischen Ausgleich.

In gleicher Weise war nun darzustellen, wie die *Lösungsmittel*, die zur Herstellung der in früheren Versuchen angewandten *Eiweißlösungen benutzt* wurden, die Versuchsresultate allein schon beeinflußten. Hierzu hätten Ultrafiltrate verwandt werden können. Da aber die bei Bereitung dieser verschiedenen Eiweißlösungen, einschließlich der Placentarlösung, verwandten Lösungsmittel bekannt waren, so war es einfacher, sie annäherungsweise direkt herzustellen. Tabelle XVI demonstriert, in welcher Richtung der Brechungsindex beeinflußt wird durch Kochsalzlösungen mit einem Gehalt von 0,2 Proz. $NaHCO_3$ bzw. $NaOOCCH_3$, die spurweise alkalisch reagierten. Auch bei diesen sind Abweichungen von dem nach der Mischungsregel additiv errechneten Werte deutlich bei Gesunden- und Gravidenseren, ebenso bei Casein- und Placentarlösungen. Diese beobachtete Erniedrigung bleibt aber aus, wenn zur Halbverdünnung nur physiologische Kochsalzlösung benutzt wird, sie ist demgemäß nicht Folge eines Pipettenfehlers, da mit genau geeichten Pipetten gearbeitet wurde, und wegen der höheren Viskosität der Eiweißlösungen und dem hierdurch bedingten nicht restlosen Auslauf beide Pipetten mit der Mischung noch zweimal durchspült wurden. Kontrollbestimmungen nach 2, 4 und 6 Stunden, von denen nur die nach 4 Stunden bei Übereinstimmung der Kürze wegen wiedergegeben sind, belegen auch hier den schnellen Ausgleich von Umsetzungen mit optischen Änderungen innerhalb der ersten 10 Minuten. Dieser Faktor war mithin vom Versuchsgang ausgeschlossen, kam also für den Ausfall der Resultate in Tabelle XII und XIII nicht in Betracht. Noch klarer geht dies aus Tabelle XVII hervor, in der sechs Sera von Schwangeren (zwei mit Lues) und Gesunden nur mit den gepufferten Lösungen statt mit den verschiedenen Eiweißlösungen wie in Tabelle XIII angesetzt wurden. Optische Änderungen gelangten nur in geringem Maße zur Beobachtung, das Alkoholverfahren brachte völlig negativen Ausfall. Die Beschaffenheit des *Lösungsmittels*, das für die verschiedenen Eiweißlösungen verwandt wurde, war demnach *nicht für den positiven Ausfall* der Versuche im System: Serum und Eiweißlösung, anzuschuldigen.

Wenn also Reaktion, Zusammensetzung und Ionenkonzentration des Lösungsmittels (die p_H-Bestimmung war ohne Benachteiligung der rein qualitativen Versuche unterlassen worden) allein noch nicht die festgestellte Änderung im Reaktionssystem verursachten, so blieb noch die Feststellung

Tabelle XVII.

Art des Serums	Art des Zusatzes 0,9 proz. NaCl + Puffer	I. W. der Mischung*)	Ninhydrinpr.	I. W. der Mischung nach 24 Stdn.		Alkoholverfahren	
				37°	8°	37°	8°
Gesund ♂	0,2 proz. $NaHCO_3$	1029	—	1032	1022	—	—
	0,2 „ $NaOOCCH_3$	1019	—	1051	1017	—	—
	—	1881	—	1891	1889	—	—
Gesund ♀	0,2 „ $NaHCO_3$	911	—	909	908	—	—
	0,2 „ $NaOOCCH_3$	886	—	881	884	—	—
	—	1664	—	1664	1664	—	—
Grav. m. VIII.	0,2 „ $NaHCO_3$	878	—	877	877	—	—
	0,2 „ $NaOOCCH_3$	854	—	854	853	—	—
	—	1590	—	1590	1586	—	—
Grav. m. VIII.	0,2 „ $NaHCO_3$	930	—	935	930	—	—
	0,2 „ $NaOOCCH_3$	912	—	915	912	—	—
	—	1701	—	1701	1700	—	—
Grav. m. VIII. Lues latens (Wa R —)	0,2 „ $NaHCO_3$	886	—	887	885	—	—
	0,2 „ $NaOOCCH_3$	859	—	855	856	—	—
	—	1627	—	1627	1627	—	—
Grav. m. VIII. Lues III (Wa R ++)	0,2 „ $NaHCO_3$	902	—	906	902	—	—
	0,2 „ $NaOOCCH_3$	908	—	907	908	—	—
	—	1705	—	1709	1707	—	—

*) 10 Minuten nach der Mischung, d. h. nach Ausgleich, s. Text.

übrig, ob etwa die *Kolloidnatur* der zugesetzten Eiweißlösungen den Abbau dieser Eiweißkörper oder den des Serums bewirkte. Es war zu untersuchen, ob hierbei Serumfermente erst zur Wirksamkeit gelangten, sei es durch Labilisierung des Systems, Beseitigung von Hemmungsvorrichtungen, die einer Fermentwirkung entgegenstanden, und sekundäre Begünstigung des Eiweißzerfalls. Die Entscheidung wurde erwartet durch die mögliche *Vertretbarkeit einer Eiweißlösung* des Gemisches, entweder des Serums oder der zugesetzten Eiweißlösung, durch andere *hydrophile Kolloide*, wobei *Gummi* und *Gelatine* (*Merck*) am geeignetsten schienen. Das erstere ist gegenüber Serum ein schwaches Fällungs-, das letztere mehr ein Schutzkolloid.

Bei einer Untersuchung ihres Einflusses auf den Brechungswert bei Mischungen fanden sich zum Teil geringe *Erhöhungen über den additiv* errechneten *Wert*, die aber gemäß Tabelle XVIII auch in *10 Minuten zum Ausgleich* und Ausschluß vom Versuch gelangt sind. Der positive Ausfall ist um so bemerkenswerter, als Verdünnungskurven von Gummi und Gelatine (Tabelle XIX) mit destilliertem Wasser, desgleichen auch mit Kochsalz, einen zunehmenden Abfall der I. W. und optischen Dichte vom linear berechneten Werte in schwachem Maße noch innerhalb der zur Verwendung gelangten Konzentration aufweisen. Die Tabelle läßt auch deutlich erkennen, daß eine kurvenmäßige Darstellung der Beziehung zwischen Konzentration und Refraktion für Gummi- und Gelatinelösung bei einem Konzentrationsverhältnis von

Tabelle XVIII.

I. W. bei Mischung gleicher Teile von	—	10proz. isot. Gummilösung					5proz. isot. Gelatinelösung				
		berechnet	ermittelt nach		Diff.*) nach		berechnet	ermittelt nach		Diff.*) nach	
			10 Min.	4 Stdn.	10 Min.	4 Stdn.		10 Min.	4 Stdn.	10 Min.	4 Stdn.
Serum normal ♂	1646	—	—	—	—	—	1481	1508**)	1482	+ 27	+ 1
„ „ ♀	1631	1463	1475	1474	+ 12	+ 11	11 474	1484	1484	+ 10	+ 10
„ Diabetes	1786	1541	1551	1550	+ 10	+ 9	1551	1548	1549	— 3	— 2
„ Grav. m. VIII	1590	1442	1441	1436	— 1	— 6	—	—	—	—	—
„ „ „ VII–VIII + Lues	1641	—	—	—	—	—	1479	1480	1481	+ 1	+ 2
Casein 10Proz.	1744	1519	1288 †)	1292 †)	— 231	— 227	1530	1538	1541	+ 8	+ 11
		1519	1280	1285	— 239	— 234	1530	1540	1533	+ 10	+ 3
Placenta 2Proz.	717	1006	1004	1002	— 2	— 4	1016	1014	1016	— 2	0
		1006	1006	1002	—	— 4	1016	1010	1010	— 6	— 6
—	—	—	1295	—	—	—	—	1316	—	—	—

I. W. bei Mischung gleicher Teile von	—	10proz. isot. Caseinlösung					2proz. Placenterlösung I				
		berechnet	ermittelt nach		Diff.*) nach		berechnet	ermittelt nach		Diff.*) nach	
			10 Min.	4 Stdn.	10 Min.	4 Stdn.		10 Min.	4 Stdn.	10 Min.	4 Stdn.
Serum normal ♂	1646	1695	1746	1746	+ 51	+ 51	—	—	—	—	—
„ „ ♀	1631	—	—	—	—	—	1174	1171	1165	— 3	— 9
„ Diabetes	1786	—	—	—	—	—	1252	1255	1259	+ 3	+ 7
„ Grav. m. VIII	1590	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ VII–VIII + Lues	1641	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Casein 10Proz.	1744	—	—	—	—	—	1231	1195††)	1218	— 36	— 13
Placenta 2Proz.	717	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*) Abweichung vom errechneten Wert. — **) 1508 Streifenverwechslung (?) — 25 = 1483. — †) Starke Abnahme durch Caseinfällung. — ††) 1195 Streifenverwechslung (?) infolge Trübung + 23 = 1218.

Tabelle XIX.

Gummi				Gelatine			
Differenz	Zuwachs + 448	I. W. ermittelt	Konz. Proz.	Konz. Proz.	I. W. ermittelt	Zuwachs + 453	Differenz
194	1792	1986	15,0	10	1983	1812	171
104	1344	1448	10,75	7,5	1445	1359	86
38	896	934	7,5	5,0	934	906	28
0	448	448	3,75	2,5	453	453	0

3 : 2 fast genau gleichen Verlauf zeigt. Die weitere Prüfung führte zu der Feststellung, daß isotonische und gepufferte Gummi- oder Gelatinelösungen den zwischen Serum und Eiweißlösungen erzielten *Reaktionsausfall*, wenn sowohl Serum als auch Eiweißlösung durch beide zur Vertretung kam, *nicht völlig reproduzieren* konnten. Die zur Beobachtung gelangten Refraktionsänderungen waren gering oder doch bedeutend niedriger, die Ninhydrinreaktion nur gelegentlich schwach positiv.

Hieraus läßt sich folgern, daß auch der Kolloidnatur der Zusätze entspringende Eigenschaften nicht genügten, um nennenswerte Eiweißspaltung auszulösen und auch den Brechungsindex in annähernd gleicher Stärke zu beeinflussen. Es ist demnach anzunehmen, daß sowohl *diese* als auch die früher *in Erwägung gezogenen Faktoren* zum Zustandekommen der *Proteolyse nicht maßgebend* sind. Aus einem Vergleich der tryptischen Fermentwirkung in Tabelle XIV mit den Versuchen in Tabelle XII und XIII, die die Einwirkung von Gesunden- oder Schwangerenseren auf Placentareiweißlösung und differente Proteinlösungen darstellten, ergibt sich eine weitgehende Parallelität hinsichtlich der aus dem Ausfall der Ninhydrinreaktion erkennbaren Eiweißspaltung und der interferometrisch beobachteten Veränderung der Refraktion, so daß damit die Feststellung *tryptischer Fermentwirkung des Serums* erbracht scheint. Weiter kann man erkennen, daß die tryptische Eigenschaft des Serums *bei Graviden stärker als bei Gesunden* ist. Eine *Spezifität* läßt sich jedoch *nicht nachweisen*, zum mindesten aber ist diese durch eine unspezifische Proteolyse überdeckt und dem Nachweis entzogen. In *keiner* Weise kann die *Refraktionsänderung* des Serums oder Reaktionsgemisches *als sicheres Merkmal proteolytischer Fermentwirkung* angesprochen werden, da sie nur eine Nebenerscheinung dieses Prozesses ist und mit Wahrscheinlichkeit von einer Reihe anderer Faktoren und intermediär durch den Eiweißzerfall auftretender Prozesse zustande kommt. Die Frage aber nach dem Angriffspunkt des tryptischen Serumferments, die zu scheiden hat zwischen den Serumeiweißkörpern selbst und dem Protein der zugesetzten Substrate der Eiweißlösung, läßt sich durch Variation der

Tabelle XX.

Art der Eiweißlösung	Art der Zusatzlösung*)	I.W. der Mischung	Ninhydrinpr.	I.W. der Mischung nach 24 Stdn.		Alkoholverfahren	
				37°	8°	37°	8°
—	Gummi 10 proz.	1296	—	1298	1296	—	—
	Gelatine 5 „	1316	—	1312	1311	—	—
10 Proz. Casein	Gummi 10 „	1270	—	1285	1280	—	—
	Gelatine 5 „	—	—	1540	1533	—	—
10 „ Serum-	Allein	1744	—	1757	1756	—	—
albumin	Gummi 10 „	—	—	1053	1052	—	—
2 „ Placenta I	Gummi 10 „	1002	—	1006	1002	Sp	—
	Gelatine 5 „	1011	—	1010	1010	—	Sp
	Allein	717	—	720	717	—	—
Serum norm. ♂	Gummi 10 „	1611	—	1616	1611	Sp?	—
	Gelatine 5 „	1598	—	1604	1595	Sp?	—
	Allein	1881	—	1891	1889	—	—
Serum norm. ♀	Gummi 10 „	1524	—	1532	1522	—	—
	Gelatine 5 „	1496	—	—	1500	Sp?	—
	Allein	1664	—	1664	1664	—	—
Serum	Gummi 10 „	1461	—	1466	1458	—	—
Grav. m. VIII.	Gelatine 5 „	1438	—	1438	1430	—	—
	Allein	1590	—	1590	1586	—	—
Serum	Gummi 10 „	1527	—	1523	1513	—	Sp?
Grav. m. VIII.	Gelatine 5 „	1505	—	1506	1506	—	—
	Allein	1701	—	1701	1700	—	—
Serum	Gummi 10 „	1451	—	1452	1452	—	—
Grav. m. VIII.	Gelatine 5 „	1472	—	1478	1476	—	—
Lues lat.	Allein	1627	—	1627	1627	—	—
Serum	Gummi 10 „	1494	—	1494	1494	—	—
Grav. m. VIII.	Gelatine 5 „	1480	—	1486	1486	—	—
+ Lues III	Allein	1705	—	1709	1707	—	—

*) Gummi und Gelatine *Merck*.

zugesetzten Substrat- und Eiweißlösungen, durch Feststellung der optimalen Reaktionsbedingungen oder Adsorptionsversuche nicht entscheiden.

Dies zeigen bereits Adsorptionsversuche mit verschiedenen Adsorbenzien, bei denen die Verhältnisse noch relativ übersichtlich liegen. Im Gegensatz zu *Plaut*, der jedoch mit dem Dialysierverfahren arbeitete, findet sich bei Nichtschwangerenseren mit dem Alkoholverfahren keine Zunahme der Spaltprodukte durch Ausschüttelung mit Adsorbenzien im Vergleich zu den zusatzfreien Seren. Durch den Vorgang des Schüttelns sowie *des Ausschüttelns mit Bleiacetat, Bolus, Kohle, Kaolin* und *Kieselgur* werden die mit dem Alkoholverfahren nachzuweisenden *Abbauprodukte nicht erkennbar vermehrt* (Tabelle XXI). Bei genügend *langer* Aufbewahrung sind die *Ausfälle* der Ninhydrinprobe (Tabelle XXI, Serum 4 bis 10) *stärker*, aber entsprechend. Es

Tabelle XXI.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Serum	Behandlung	Ausfall des Alkoholverfahrens bei Zusatz von							
		Bleiacetat	Bolus alba	Carbo animal.	Kadin	Kieselgur	Quarzsand	ohne, geschüttelt	ohne, nicht geschüttelt
1. Gesund	20 Stdn. bei 8° C. 2stündl. geschüttelt	—		—		—	—	—	
2. Hypertonie		—		—		Spur	—	—	
3. Nephrosklerose		—		+		„	++	++	
4. Gesund	40 Stdn. bei 20° C. etwa alle 4 bis 5 Stdn. geschüttelt	Spur	+	+	+	+	+	Spur	+
5. Arteriosklerose		„	+	+	++	+	++	++	+
6. Hypertonie		„	+	Spur	+	+	++	+	+
7. Bronchitis		„	Spur	0	Spur	+	+	+	+
8. Nephrosklerose		„	+	Spur	++	+	+	+	++
9. Urämie		—	Spur	—	++	+++	++	++	+
10. Myocarditis		Spur	„	—	+	++	++	+	+

scheint demnach eine *Adsorption von Abbauprodukten* an das Adsorbens stattzufinden, was ja schon hinsichtlich des Eiweißes bei der Koagulation oben vermerkt wurde.

In Tabelle XXII ist nun die Beziehung der *Brechungsänderung* und *der Menge* mit Ninhydrin nachzuweisender *Eiweißspaltstücke* untersucht. Beträchtliche *Refraktionsabnahme* erfolgt durch Adsorption mittels *Bolus, Kaolin und Kieselgur, geringere bei Kohle.* Diese Abnahme ist vorwiegend durch *Eiweißkörperadsorption* bedingt. Dies ließ sich in anderen Versuchen durch die quantitative Fibrinogenbestimmung vor und nach Ausschüttelung von Plasma mit Adsorbenzien direkt nachweisen, wobei die Wahl des Fg als besonders leicht adsorbierbarem Eiweißkörper sehr geeignet ist. Infolgedessen ist nun der refraktometrische Ausdruck der Mitadsorption von Abbauprodukten einer Untersuchung unzugänglich. Um den mechanischen Effekt des *Schüttelns* von Serum mit dem suspendierten Pulver getrennt zu beobachten, wurde in gleichartiger Versuchsanordnung dieser Vorgang mit nicht adsorptionsfähigem, subtil pulverisiertem *Quarzsand* untersucht. Außerdem wurden durch Verstärkung der Ninhydrinprobe (s. Bemerkung zu Tabelle XXII) die Verhältnisse übersichtlicher gestaltet (gleiche Tabelle, Fall 4 bis 8). Eine gesetzmäßige *Beziehung zwischen Adsorptionsfähigkeit* und *Menge der gebildeten Spaltprodukte* besteht nun *nicht*, im Gegenteil ist die Ninhydrinprobe bei den Serumsuspensionsgemischen *geringer als bei* den entsprechenden *Kontrollen.* Bei diesen hat bereits Aufbewahrung bei *Brutschranktemperatur, Schütteln*, jedoch nicht Ausschütteln mit Quarzsand eine regelmäßige *Dichteerhöhung* zur Folge. Waren die Abbauprodukte zur Adsorption gelangt, so

Tabelle XXII.

1	2			3			4			5			6		
Serum	Bleiacetat *†)			Bolus alba			Carbo animalis			Kaolin			Kieselgur		
	I. W.	Diff. *)	Alkohol-Verf. ††)	I. W.	Diff.	Alkohol-Verf.	I. W.	Diff.	Alkohol-Verf.	I. W.	Diff.	Alkohol-Verf.	I. W.	Diff.	Alkohol-Verf.
1. Gesund	üb. 3000	?	—	1541,5	— 207	—	1742	— 9	—	1717,5	— 38,5	—	1735,5	— 18	—
2. Obstipation . .	„	?	—	1550,5	— 194	—	1742	— 5	—	1718,5	— 33,5	Sp	1731,5	— 18	Sp
3. Abgel. Grippe .	„	?	—	1436	— 197,5	—	1626	— 11	—	1610	— 32	—	1606	— 33,5	—
4. Enuresis **) . .	2071	?	+	1533,5	— 205,5	+	1724	— 17,5	Sp	1730	— 16,5	++	1728,5	— 15,5	++
5. Vagotonie . . .	üb. 3000	?	+	1550	— 208	Sp	1760	— 0,5	Sp	1705	— 57,5	+	1743	— 20	+
6. Magenneurose †)	„	?	+	1418	— 211,5	+	1627	— 5	Sp	1600	— 37	++	1614	— 20,5	+
7. Cystitis	„	?	+	1583	— 187	Sp	1757	— 5,5	Sp	1737	— 30,5	+	1749	— 16	++
8. Hysterie	„	?	+	1533,5	— 171,5	+	1699,5	— 12	Sp	1698,5	— 19	++	1675	— 30	++
9. H_2O-Kontrolle .	2822!		—	0		—	2,5		—	7,5		—	5,0		—

	7			8			9			10		
Serum	Quarzsand			Ser.-Kontrolle allein 37° C, geschüttelt			Ser.-Kontrolle allein 37° C, nicht geschüttelt			Ser.-Kontrolle allein 8° C		
	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren
1. Gesund	1749	— 2,5	—	1748,5	0	—	1742	— 6,5	—	1740	— 8,5	—
2. Obstipation . .	1741,5	— 6	Sp?	1744,5	0	Sp?	1743	— 1,5	Sp	1736	— 8,5	Sp
3. Abgel. Grippe .	1632,5	— 5	—	1634,5	0	Sp?	1629,5	— 5	—	1629	— 5,5	—
4. Enuresis **) . .	1738	— 4	+	1739	0	++	1731	— 8	++	1729	— 10	++
5. Vagotonie . . .	1760	— 2	Sp	1758	0	+	1753,5	— 4,5	+	1751,5	— 6,5	++
6. Magenneurose †)	1624	— 8,5	Sp	1629,5	0	+	1627	— 2,5	+	1626,5	— 3	+
7. Cystitis	1759	— 4	++	1760	0	+	1759,5	— 0,5	++	1756,5	— 3,5	+++
8. Hysterie	1706	— 7	++	1709	0	++	1705	— 4	+++	1702	— 7	+++
9. H_2O-Kontrolle .	3		—	0		—				0		—

*) Differenz stets im Vergleich mit Stab 8, Wasserkontrollwert abgezogen. — **) Serum 4 und 5 2stündlich geschüttelt, 20 Stdn. bei 37° C. Alkoholverfahren mit dem Filtrat (= Serum) allein. — †) Serum 6 bis 8 2stündlich geschüttelt, 20 Stunden bei 37° C. Alkoholverfahren mit Serum + Adsorbens. — ††) Alkoholverfahren in Fall 1 bis 3 wie üblich, s. Text, in Fall 4 bis 8 verschärft, 0,5 Serum + 5 ccm Alkohol, 96 proz. + 0,5 ccm 1 proz. Ninhydrin. — *†) Blei-

Tabelle XXIII.

Serum	Art der Behandlung	Bolus alba			Carbo animal.			Carbo animal.			Kaolin			Kieselgur		
		I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren
1. Carvicalgonorrhoe . . .	20 Stdn. 37° C. Sera a. d. Höhe d. Verdauung entnommen	1468	− 158	+	1637	− 15,5	++	−			1616	− 41,5	+++	1642	− 13	
2. Diabete melitis		1387	− 199	++	1697	− 11,5	++	−			−		+++	1565	− 26	
3. Mann, gesund		1597	− 151	+++	1752	+ 1,5	+++	−			−		++	1736	− 17	
4. Grav. mens VIII . . .	20 Stdn. 37° C. Alkoholverf. m. Einschl. d. Adsorbentien	—		Sp	1467	− 42,5	++	−		+	1469	− 55,5	++	1504	− 8	+
5. Grav. mens IX, Lues III		1466	− 177	+	1616	− 29,5	++	1619	− 20,5	+	1597	− 53,5	+	1636	− 11	+
6. „ „ IX		1398	− 180	+++	1517	− 63,5	+++	1505	− 77,5	++	1538	− 47,5	++	1565	− 10	+
7. „ „ IX–X . . .		1375	− 171	++	1501	− 47,5	++	1502	− 46,5	+	1503	− 50,5	+	1507	− 19	+
8. „ „ X		—		+++	—		++	−		++	−		+++			++

Serum	Art der Behandlung	Quarzsand			Allein, geschüttelt			Allein, nicht geschüttelt			Kontrolle allein, 8° C		
		I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren	I. W.	Diff.	Alkoholverfahren
1. Cervicalgonorrhoe . . .	20 Stdn. 37° C. Sera a. d. Höhe d. Verdauung entnommen	1652	+ 1	++	1650	0	++	1649	− 1	++	1638	− 12	+
2. Diabete melitis		1577	− 12	+	1586	0	++	1577	− 9	++	1576	− 10	++
3. Mann, gesund		1742,5	− 8,5	++	1748	0	Sp	1746,5	− 1,5	−	1745	− 3	−
4. Grav. mens VIII . . .	20 Stdn. 37° C. Alkoholverf. m. Einschl. d. Adsorbentien	1508	− 2	+	1507	0	Sp	1503	− 4	+	1499	− 8	+
5. „ „ IX, Lues III		1626	− 20	+	1643	0	+	1640	− 3	++	1638	− 5	++
6. „ „ IX		1562	− 11	+	1570	0	Sp	1563	− 7	+	1558	− 12	+
7. „ „ IX–X . . .		1528	− 21	++	1546	0	+	1546	0	++	1548	+ 2	++
8. „ „ X		−		++	−		++	−		++	−		++

konnte versucht werden, sie bei Extraktion der benutzten Pulver im Alkoholverfahren wiederzuerhalten. Ein Vergleich des Ausfalls der Ninhydrinprobe derjenigen *Seren*, die klar nach *Abzentrifugierung des Adsorbens* (1 bis 5) mit denjenigen, die *mit dem Pulver* zugleich im Alkoholverfahren bestimmt wurden, ergab *keinerlei Differenzen*, die diese Annahme sichern konnten.

Schwangerensera, ebenfalls auf der Höhe des Verdauungsprozesses entnommene Sera, erwiesen sich übereinstimmend mit den früheren Versuchen auch hier von *stärkerer* Beeinflußbarkeit, sowohl im Hinblick auf die *Menge gebildeter Spaltprodukte, die Stärke der Eiweißadsorption*, wie auch die *Abnahme des I. W.* Prinzipiell ergaben diese Versuche das gleiche Ergebnis, wie mit den übrigen Nichtschwangerenseren (Tabelle XXIII). Also auch in dieser Versuchsanordnung läßt sich kein Zusammenhang zwischen eiweißspaltender Fermentwirkung und Refraktionsänderung erkennen. Weitere Aufschlüsse sind von der Heranziehung der interferometrischen Analyse nicht zu erwarten, womit das Thema der Arbeit erschöpft scheint, da die Untersuchung der Fermentprozesse hier nur im Hinblick auf gleichzeitige optische Dichteänderungen erfolgen sollte.

Am Schluß danke ich Frl. Dr. *Erna Meyer* für wertvolle Mithilfe bei den Untersuchungen. Das Literaturverzeichnis blieb auf Wunsch der Redaktion fort.

Die Permeabilität der Kollodiummembranen.

Von

Raphael Ed. Liesegang.

(Institut für physikalische Grundlagen der Medizin der Universität Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 11. August 1926.)

Auf Grund der außerordentlich vielen Anwendungen für die Dialyse und Ultrafiltration hatte man die Permeabilität der Kollodiummembran derart zu beherrschen gelernt, daß damit das Erforschenswerte erschöpft schien. Erneutes Interesse entstand dann jedoch infolge der Studien von *L. Michaelis* und *A. Fujita*[1]) über die Durchlässigkeit der trockenen Kollodiumhäute. Aber auch damit dürfte die Angelegenheit nicht zum Abschluß gekommen sein, denn aus etwa 10000 Protokollen über eine eigene Versuchsreihe ersehe ich immer wieder, daß die Durchlässigkeit des trockenen Kollodiums der Größenordnung nach eine durchaus andere war als sie nach den Angaben von *Michaelis* erwartet werden mußte. Und trotzdem sollen letztere hier nicht im geringsten angefochten werden. Die Versuchsbedingungen unterscheiden sich um ein geringes, das ich zuerst nicht in Rechnung gesetzt hatte.

Zur Herstellung der Ultrafiltermembranen wird gewöhnlich eine poröse Unterlage, z. B. aus keramischem Material oder Filtrierpapier, mit dem Kollodium durchtränkt. Man könnte verleitet sein, dieses Prinzip mit der Unterlage auch zu den *Michaelis*schen Versuchen zu verwenden, d. h. man würde eine auf Papier gezogene Schicht von Äther-Alkohol-Kollodium (da der Eisessig die Ultrafilterschichten zu permeabel machen würde) eintrocknen lassen. Und man würde erstaunt sein, daß die Kollodiumhaut gar nicht jene Abdichtung gegen die meisten jener wässerigen Salzlösungen herbeiführt, für welche die trockene Kollodiumhaut nach *Michaelis* undurchlässig ist. Der Unterschied beruht allein darin, daß *Michaelis* seine Membran ohne solche Stützschicht trocknen läßt. Er beschreibt dieses Verfahren, ohne

[1]) Diese Zeitschr. **161**, 47, 1925; **164**, 23, 1925.

darauf hinzuweisen, daß in diesem Freitrocknen ein Faktor von grundlegender Bedeutung enthalten ist.

Die freitrocknende Kollodiumhaut schrumpft nämlich erheblich zusammen. Man kann sich vorstellen, daß es hierbei zu einer stärkeren Verminderung der Poren kommt, welche das Verdunsten des sehr reichlich vorhandenen Lösungsmittels veranlaßt, als bei jenen Schichten, deren Schrumpfung durch den Kontakt mit der starren Unterlage gehindert ist.

Einige Beispiele mögen die große Differenz gegenüber *Michaelis* zeigen, der gefunden hatte, daß Salze überhaupt nicht mehr durch die trockene Kollodiummembran hindurchdiffundieren, wenn ihre Geschwindigkeit bei freier Diffusion kleiner als die Hälfte derjenigen des KCl ist.

Wie bei *Michaelis* wurde 4proz. Kollodium auf einer Glasplatte ausgebreitet, dann jedoch nicht abgezogen, sondern nach eintägiger Trocknung mit einer Glycerin und NaCl enthaltenden Gelatineschicht überzogen. Letztere ließ sich nach dem Erstarren mit der Kollodiumhaut leicht von der Glasplatte abziehen. Dieses Material diente zu einigen Diffusionsversuchen: Es wurden Streifen davon mit der Gelatineseite auf eine Glasplatte gelegt, welche einen Überzug mit einer Glycerin und $AgNO_3$ enthaltenden Gelatinegallertschicht erhalten hatte. War das NaCl molekular mehrwertig, so drang es in die $AgNO_3$-Gallerte hinein. Trennte man die Schichten nach einem Tage wieder, so fand sich eine dichte AgCl-Trübung in der $AgNO_3$-Schicht. Umgekehrt war es bei molekularer Mehrwertigkeit des $AgNO_3$. Legte man nun den NaCl-Streifen mit der Kollodiumseite auf die $AgNO_3$-Gallerte, so war nach einem Tage kein Unterschied in der AgCl-Trübung gegenüber den vorgenannten Anordnungen zu finden. NaCl und $AgNO_3$ diffundieren also überraschend schnell durch das Kollodium.

Es könnte hier die Verwendung des Glycerins Bedenken erregen, da *Fujita* fand, daß dasselbe, wenn auch sehr langsam (in mehreren Tagen), durch das trockene Kollodium zu dringen vermöge. Dadurch könnte es Poren für den Salzdurchtritt schaffen. Deshalb wurde Papier mit Kollodium überzogen und nach eintägigem Trocknen eine silbernitrathaltige Gelatinelösung auf die kollodionierte Seite gebracht. Nach einigen Tagen zeigte die Bräunung des Papiers an, daß $AgNO_3$ in dasselbe eingedrungen sei. Das Betupfen mit einem photographischen Entwickler ließ tiefe Schwärzung auftreten. An der hohen Durchlässigkeit der in Spannung getrockneten Membran ist also nicht mehr zu zweifeln.

Einwandfrei ist dieser Versuch auch nur dann, wenn das Papier eine vollkommen glatte Oberfläche hat. Ein kurzes Eingehen hierauf ist angebracht, weil Filtrierpapiere, also Papiere mit unebener Oberfläche, zur Herstellung von Ultrafiltern verwendet worden sind. Ein Papier, welches eine ganz regelmäßige Prägung in Form sehr kleiner

Pyramiden erhalten hatte, wurde erst mit Kollodium, dann mit $AgNO_3$-Gelatine überzogen. Bei geeigneter Wahl des Papiers läßt sich diese Doppelschicht im trockenen Zustande abziehen. Man sieht dann, wie das $AgNO_3$ bevorzugt an den Spitzen der Pyramiden eingedrungen ist. Hier ist die Kollodiumschicht am dünnsten, denn das Kollodium hat sich beim Guß in den Tälern angesammelt. Legt man eine solche abgezogene Schicht mit der Kollodiumseite auf eine frisch gegossene Bichromat-Gelatineschicht, so findet man die Spitzen als rote Flecke wieder. Eine auf rauher Unterlage gegossene Kollodiumschicht ist also in hohem Grade unhomogen.

Michaelis und *Fujita* haben meist mit Kollodiumschichten gearbeitet, welche (nur) einen Tag getrocknet worden waren. Das ist ein für die Permeabilität sehr günstiger Umstand, denn Kollodiumschichten verlieren beim Trocknen an der Luft die letzten Reste ihres Lösungsmittels erst in viel längerer Zeit. Jene Spuren von Lösungsmitteln vermitteln aber den Durchtritt in hohem Maße, indem sie im Kontakt mit einer wässerigen Lösung bald durch Wasser ersetzt werden (obgleich dieses an sich kein Quellungsmittel für die Nitrocellulose ist). Bei dieser „Pseudomorphose von Wasser nach Äther-Alkohol" erinnere ich an einen älteren Versuch[1]): Eine mit einer trockenen Gelatineschicht behandelte Glasplatte wird mit einer Kollodiumschicht überzogen und diese wochenlang getrocknet. Badet man sie nun in wässeriger Methylenblaulösung, so färbt sich die Gelatine keine Spur an, weil kein Farbstoff hinkommen kann. Bestreicht man aber vorher eine Stelle mit Alkohol, der ziemlich wasserhaltig sein kann, spült diesen dann gründlich mit Wasser hinaus, so färbt sich die Gelatine unter der pseudogequollenen Stelle sofort tief mit Methylenblau an.

Michaelis hatte einige Schwierigkeit, den Durchtritt von Wasser durch trockenes Kollodium (mittels einer osmotischen Methode) nachzuweisen. Nicht allein für diese, sondern auch für andere Permeabilitätsuntersuchungen sei ein viel einfacheres Verfahren angegeben: Glasplatten werden mit einer Mischung von etwa gleichen Teilen (Kautschuk-) Latex und 12proz. Gelatinelösung überzogen. Im trockenen Zustand zeigt diese Schicht nur eine schwache Mattur, sie hemmt den Lichtdurchtritt aber fast nicht. Ganz anders ist es, wenn sie mit Wasser angefeuchtet wird. Sie wird undurchsichtig weiß, weil nun ein sehr großer Unterschied im Brechungsindex der Kautschuktröpfchen und ihrer Umhüllung zustande kommt. Überzieht man eine solche trockene Schicht mit Kollodium und befeuchtet sie in verschiedenen Trocknungszuständen (nach einem Tag oder nach Wochen) mit Wasser, so sieht man das Milchigwerden der Unterlage um so langsamer auftreten, je trockener die Kollodiumschicht war.

Bei einer kleinen Abänderung des Versuchs ist eine scheinbar paradoxe Erscheinung zu beobachten: Nachdem die vorgenannte Kollodiumschicht einige Stunden getrocknet ist, kommt an einer Stelle eine Gelatineschicht darauf, die man ebenfalls trocknen läßt. Dann wird dieses System monatelang aufbewahrt. Legt man die Schicht jetzt in Wasser, so tritt trotz der Mehrbedeckung unter dem Gelatine-

[1]) *R. E. Liesegang*, Zeitschr. f. biol. Techn. 2, 151, 1910.

strich das Weißwerden viel rascher auf als an den unbedeckten Stellen[1]). Man wird dabei an die kolloiden Konservierungsmittel bei der Herstellung der alten Kollodiumtrockenplatten in der Photographie erinnert. Die Erscheinung wird auch dann zu berücksichtigen sein, wenn man einmal das Prinzip der Doppelmembran von *J. Loeb* auf trockenes Kollodium überträgt.

Zusammenfassung.

Kollodiummembranen besitzen dann eine weit höhere Permeabilität als man sie nach den Feststellungen von *L. Michaelis* und *A. Fujita* erwarten sollte, wenn sie nicht im freien, sondern im gespannten Zustande getrocknet wurden. Da hierbei die Poren stärker erhalten bleiben, kommen sie in ihren Eigenschaften den von *Michaelis* studierten Paraffinmembranen näher.

---

[1]) Kommt es darauf an, den Durchtritt von undurchsichtigen oder stärker gefärbten Häuten, z. B. von Blütenblättern zu zeigen, so legt man eine dünne Schicht von Tuschegelatine über die Latexgelatine und studiert von der Rückseite das Weißwerden. — Man kann die Membranen auch auf die noch gequollene Latexgelatine legen und nun die Trocknungsverzögerung durch die aufgelegte Membran verfolgen.

Die Abhängigkeit der Wassermannreaktion von den Globulinen[1]).

Von

J. Forssman.

(Aus dem pathologischen Institut und der venereologischen Abteilung der Universität Lund, Schweden.)

(Eingegangen am 11. August 1926.)

Man würde vielleicht geneigt sein, sich vorzustellen, daß die in letzter Zeit von *Sachs, Klopstock* und *Weil* (1) über die Wassermannreaktion ausgeführten Untersuchungen den Globulinen jene Rolle ganz entzogen hätten, die man ihnen bei genannter Reaktion früher zugeschrieben hat. Dies ist indessen nicht der Fall. Seit *Landsteiner* und *Sims* (2) gezeigt haben, daß das lipoide *Forssman*-Antigen, das ja an sein spezifisches Antiserum gebunden wird, erst nach der Mischung mit *Schweinsserum* zur Antikörperbildung führt, fanden *Sachs, Klopstock* und *Weil*, daß sich der lipoide Extrakt von z. B. Kaninchenorganen auf die gleiche Weise verhält; sie konnten also durch die Injektion dieses Extraktes, nicht allein, aber *gemischt mit Schweinsserum*, bei Kaninchen bewirken, daß mit deren Serum eine stark positive Wassermannreaktion (WR) erhalten wurde. *Aber das sichtbare Auftreten der Serumveränderung, zustandegekommen durch die gegebenen Injektionen, ist ja indessen die Komplementbildung*, und hinsichtlich dieser sind die genannten Verfasser fortwährend der Ansicht, die *Sachs* (3) schon seit langem vertreten hat, daß sie nämlich auf einer Dispersitätsveränderung beruht, einer „Dispersitätsvergröberung" der Globuline, die ihrerseits eine Folge der Antigen-Antikörpervereinigung in vitro ist.

Für andere, z. B. *Weissbach* (5), ist auch die Dispersitäts-„Labilität" der Globuline für die Komplementfixierung bei der WR das Entscheidende, sie sind aber zum Unterschied von *Sachs* der Ansicht, daß diese Eigenschaft der Globuline intravital ist, im Organismus durch den syphilitischen Prozeß hervorgerufen. Sie ist also für diese, was

---

[1]) Vortrag, gehalten auf dem dritten skandinavischen Pathologenkongreß in Kopenhagen, den 5. bis 7. Juli 1926.

andere (6) WR-Substanz nennen, die ja den *Sachs-Klopstock-Weil*schen Antikörpern entspricht.

Die Komplementbindung wird demnach sowohl von *Sachs* und seiner Schule wie von den anderen als von den Globulinen abhängig betrachtet — von einer „Dispersitätsvergrößerung" oder „erhöhter Labilität" —; der einzige Unterschied besteht darin, daß diese Globulinveränderung für die ersteren *in vitro* bei der Mischung von Antigen und Antikörper eintritt, während sie für die letzteren *vital* ist.

Sehr bezeichnend für diese Richtungen schreibt *Lehmann-Facius* (4) kürzlich: „Jede Luesreaktion ist von einer gewissen Globulinveränderung begleitet, die bei der S. G. R. stärker zu sein pflegt als bei der M. T. R. und WR".

Für eine dritte Gruppe von Forschern, zu der ich mich rechne, ist die Rolle der Globuline bei der WR immer ungewiß gewesen, indem die Reaktion in ihrer Gänze, demnach auch die Komplementbindung, als von der Anwesenheit der sogenannten WR-Substanz im Serum abhängig gedacht wurde, die in Analogie mit einem Ambozeptor wirkte.

Daß die Globuline für die Erklärung der WR diese Stellung erhalten haben, die ihnen schon *Sachs*, *Weissbach* u. a. zugesprochen haben, beruht in der Hauptsache auf zwei Umständen. Teils war es die Erscheinung, daß nach den übereinstimmenden Resultaten einer Menge von Forschern die WR bei der Ausfällung von syphilitischen Seren mit den Globulinen folgt. Aber des weiteren auch deshalb, da die Globuline — auch von WR-negativen Seren — nach dem Ausfällen und Lösen in physiologischer Kochsalzlösung, jedoch *ohne* Inaktivierung, positive WR geben.

Es ist indessen offenbar, daß keiner dieser Gründe für die Rolle der Globuline bei der WR beweisend ist. Der erste Grund, der der starke ist, kann ja ebensogut damit erklärt werden, daß die Globuline bei ihrer Fällung die WR-Substanz adsorbieren. Und anschließend an Dialyseversuche habe ich auch gesehen, daß in einem Kollodiumsack, in dem ein WR-positives Serum dialysiert worden war, der größte Teil der erhaltenen Fällung in physiologischer Kochsalzlösung gelöst werden konnte — die Globuline —, die indessen *keine* WR gaben, während ein äußerst kleiner Rückstand erst in $n/_{1000}$ Soda und 0,8proz. NaCl löslich war, und dieser enthielt die WR-Substanz quantitativ oder, mit anderen Worten, gab die WR quantitativ (6).

Diejenigen Untersuchungen, auf die sich die Auffassung über die Bedeutung der Globuline für die WR stützt, sind in der Regel an Seren ausgeführt. Dagegen hat man dabei auf das Verhältnis der Globuline in WR-positiven Lumbalflüssigkeiten nicht genügend Rücksicht genommen.

Wie bekannt, tritt die WR in der Lumbalflüssigkeit zuweilen schon bei primärer Syphilis auf, ziemlich oft bei sekundärer, nicht ganz selten bei latenter oder manifester, später Syphilis, regelmäßig bei Paralyse und in einem großen Prozentsatz bei Tabes. Mit ihr folgt so gut wie immer eine Zellen- und Eiweißzunahme, eine Vermehrung der Globuline.

Bei gewöhnlicher Behandlung und vielleicht auch ohne Behandlung gehen diese Veränderungen in der Lumbalflüssigkeit, die von einer Meningitis herrühren, bei primärer und sekundärer Syphilis zurück; ausgenommen sind einige Fälle, wo sie von dauernderer Natur sind und erst bei intensiverer Behandlung vielleicht verschwinden oder sich verschlimmern[1]).

Wenn sie verschwindet, so geht dies oft so, daß zuerst die WR, dann und nicht selten beinahe parallel die Zellen- und die Eiweißerhöhung heruntergehen.

Bei der späten Syphilis ist die Veränderung gegen die gewöhnliche Behandlung meistens ziemlich oder vollkommen resistent, und bei Paralyse oder Tabes wird sie dadurch im allgemeinen kaum beeinflußt.

Um nun die syphilitische Meningitis in jenen Fällen, wo eine gewöhnliche Behandlung keinen Effekt hat, beeinflussen zu können, bedient man sich ja teils intralumbaler Salvarsanbehandlung, teils einer aspezifischen Therapie wie Malaria- und Rekurrenzbehandlung.

Meine persönliche Erfahrung in bezug auf diese Behandlungsformen erstreckt sich nur auf die endolumbale Salvarsanbehandlung.

Hier sieht man nun, wie die genannten Veränderungen der Lumbalflüssigkeit von der endolumbalen Salvarsanbehandlung beeinflußt werden; dies erfolgt jedoch nicht gleichförmig und außerdem verschieden in verschiedenen Fällen. Zuweilen verschwindet die WR zuerst, dann die Zellen und schließlich die Globuline, in anderen kann die Reihenfolge umgekehrt sein, und mitunter, wie im Falle *S. J.*, Tabelle I, sind die Zellen das Resistenteste. Am häufigsten dürften jedoch die Zellen zuerst verschwinden, wie *Olga M.* und *A. A.* (Tabelle II) zeigen, während die WR positiv verbleibt, damit anzeigend, daß der Zellengehalt in keiner Beziehung zur WR steht oder mit ihr keinen genetischen Zusammenhang besitzt; darauf verschwinden dann die Globuline und zuletzt, wenn überhaupt, die WR, so bei *Martin O.* und *A. A.* Wie mir Dr. *Loberg*, Krankenhaus St. Lars, Lund, freundlichst mitgeteilt hat, dürfte diese Reihenfolge nach den Erfahrungen im genannten Krankenhaus auch bei der Malariabehandlung der Paralyse die gewöhnliche sein.

Hier habe ich nun zwei Fälle, *M. O.* (Tabelle I) und *A. A.*, wo sich die WR konstant positiv auf 0,2 ccm gehalten hat und wo die Globuline

[1]) In bezug auf Prozentzahlen siehe *Schou* (7).

Tabelle 1.

Name, Datum		Wassermannreaktion in der Lumbalflüssigkeit	Nonne	Zellen	Intralumbal injiziert	Wassermannreaktion im Blute	Intravenös Neosalvarsan
M. O.							
1924 29. VIII. bis 1926 13. I. 6. V.	Lumbalpunktion 29 mal	Immer positiv in 0,2 ccm (keine Hämolysine)	Von stark positiv zu negativ	von 106 bis 3,7	29mal mit Dosen von 0,000 75 bis 0,0024 g Neosalvarsan, zus. 0,063 85 g	Positiv in 0,01, dann konstant positiv in 0,03 ccm	Während dieser Zeit zusammen 26,25 g, außerdem Hg
S. J.							
1921 15. I.	Lumbalpunkt.	Positiv in 0,2 ccm	Positiv	86		Pos. in 0,1 ccm	
23. III.	"	Ebenso	Negativ	39		" " 0,2 "	
6. VI.						Negativ	
15. IX.	"	"	"	46		Pos. in 0,1 ccm	
10. XI.						Negativ	
22. XII.	"	Positiv in 1 ccm	"	54		"	
1922 16. V.	"	Ebenso	"	30			
18. VIII.	"	Positiv in 0,2 ccm	"	54			Zusammen 27,25 g, außerdem Hg
25. VIII.	"		"	61	0,0010 g		
31. VIII.						"	
8. IX.	"	Positiv in 1 ccm	"	40	0,0015 g		
26. IX.	"	Ebenso	"	30	0,0020 g		
10. X.	"	"	"	27	0,0015 g		
31. X.	"	"	"	32	0,0015 g		
21. XI.	"	"	"	18	0,0015 g		
12. XII.	"	Negativ	"	16	0,0015 g		
1923 5. I.	"	"	"	15	0,0015 g	"	
20. III.	"	"	"	6		"	
4. IX.	"	"	"	6		"	
1926 13. IV.	"	"	"	2		"	

Tabelle 11.

Fall und Datum		Wassermannreaktion in der Lumbalflüssigkeit	Nonne	Zellen	Endolumbalinjektion von Neosalvarsan	Wassermannreaktion im Blute	Intravenös Neosalvarsan
A. A.							
1924 16. II.	Lumbalpunkt.	Positiv in 0,2 ccm	Positiv	9	0,0020 g		
8. III.	„	Ebenso	„	3	0,0030 g		
29. III.	„	„	„	6	0,0030 g	Positiv in	
12. IV.	„	„	„	4	0,0030 g	0,01 ccm, dann	Zusammen
4. IV.	„	„	„	5		allmählich in	32,30 g, außer-
2. IX.	„	„	„	2	0,0018 g	negativ über-	dem Hg oder
			(schwach)			gegangen	Wismut
1925 17. VI.	„	„	Positiv	4,7	0,0018 g		
21. XII.	„	„	Negativ	4			
O. M.							
1924 20. II.	„	„	Positiv		0,0020 g		
6. III.	„	„	„	8	0,0030 g		
18. III.	„	„	„	5	0,0030 g		
25. IV.	„	„	„	4		Positiv in	
			(schwach)		0,0025 g	0,01 ccm, dann	Zusammen
14. V.	„	„	Positiv	4	0,0015 g	allmählich in	16,5 g, außer-
3. X.	„	„	„	10	0,0020 g	negativ über-	dem Hg
17. X.	„	„	„	4	0,0015 g	gegangen	
3. XI.	„	„	„	4	11. II. Malariabeh.		
22. XII.	„	„	„	2,5	22. II. 0,0015 g		
1925 17. II.	„	„	„	2,8			
			(schwach)				
Fall Nr. 32. ♂, 29 Jahre.							
1925 26. VIII.	„	Positiv	Positiv	25	Malaria-	Positiv	
1926 23. III.	„	Positiv in 0,4 ccm	Negativ	0	behandlung	„	
Fall Nr. 34. ♂, 48 Jahre.							
1925 9. II.	„	Positiv	Positiv	21,5	Malaria-	„	
1926 20. V.	„	Positiv in 0,2 ccm	Negativ	3	behandlung	„	

allmählich verschwunden sind, und im Falle *S. J* (Tab. 1) verblie die WR lange Zeit *ohne* einen Globulingehalt bestehen.

Ein derartiges Verhältnis, daß die Lumbalflüssigkeit stark positiv WR und gleichzeitig vollkommen negative Nonne zeigt, ist keineswe häufig. Einzelne solche Beobachtungen findet man jedoch in d Literatur, z. B. bei *Schou* (7), dessen Fall 225 dieser Kategorie angehör ebenso die Fälle auf Seite 162 und 233 bei *Gennerich* (8). Im Kranke haus St. Lars zu Lund sind mir von den malariabehandelten Paralytike auch zwei Fälle (Fälle 32 und 34 in Tabelle II) gütigst zur Verfügu gestellt worden, die, wie die Tabelle zeigt, ein gleiches Bild der Lumba flüssigkeit aufweisen.

Was beweisen nun diese Beobachtungen, die von verschiedene Seiten herstammen und sich also gegenseitig bestätigen? Zur volle Evidenz, daß die Globuline für die WR keinerlei Rolle spielen und da demnach die WR weder durch eine Labilitätssteigerung der Globulin in vivo, wie *Weissbach* glaubt, oder in vitro, wie *Sachs* annimmt, beding wird. Das Wahrscheinlichste ist daher, daß die WR, einschließlich d Komplementbindung, seine Ursache darin hat, daß die Wassermann substanz — die Antikörper — wie ein Ambozeptorsensibilisator auf da Antigen wirken und daß dadurch die Komplementbindung zustand kommt.

Bei Mischung von Wassermannantigen und Luesserum entsteh ja allerdings, wie die S. G. R. und M. T. R. uns zeigen, eine Fällung vo hauptsächlich Lipoiden, woran auch Globuline beteiligt sind (*Niedhof Weissbach*), aber der Umstand, daß sich die S. G. R. in der Lumba flüssigkeit als weniger verläßlich herausgestellt hat als im Serum, beruh vielleicht gerade darauf, daß die Lumbalflüssigkeit, verglichen mit de Serum, ärmer, oft sehr arm an oder sogar frei von Globulinen ist, wi eben hier dargetan ist.

Als Schlußsatz des Obenstehenden kann demnach gesagt werden, da die Globuline für die WR keinerlei Bedeutung besitzen.

Literatur.

1) *Sachs, Klopstock* und *Weil*, Deutsch. med. Wochenschr. 1915, Nr. 1 — 2) *Landsteiner* und *Sims*, Journ. of exper. Med. 38, 1923. — 3) *Sach* Klin. Wochenschr., 4. Jahrg., 1925, Nr. 34. — 4) *H. Lehman-Facius* Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therap. 46, 1926. — 5) *Weissbach* Wassermannreaktion und Ausflockungsreaktionen, 2. Ausg., 1900. — 6) *Forssman*, Diese Zeitschr. 121, 184. — 7) *Schou*, Studies over de tidlige Syphilitiske Meningites. Kopenhavn 1922. — 8) *Gennerich*, Di Syphilis des Zentralnervensystems. Berlin 1922.

847.

U.C. MEDICAL CENTER LIBR

N 2 1962

San Francisco, 22

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, A. Bach-Moskau, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Fr. Boas-Weihenstephan, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., Wl. Butkewitsch-Moskau, M. Cremer-Berlin, R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, E. Fromm-Wien, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin, M. Hahn-Berlin, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin, K. Hess-Berlin, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, M. Kochmann-Halle a. S., R. Krimberg-Riga, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, E. J. Lesser-Mannheim, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, E. Mangold-Berlin, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, O. Meyerhof-Berlin, L. Michaelis-Nagoya, H. Molisch-Wien, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Omelianski-Leningrad, W. Ostwald-Leipzig, A. Palladin-Charkow, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, D. N. Prianischnikow-Moskau, H. Pringsheim-Berlin, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-Leningrad, T. Sasaki-Tokio, B. Sbarsky-Moskau, A. Scheunert-Leipzig, A. Schlossmann-Düsseldorf, E. Schmitz-Breslau, J. Snapper-Amsterdam, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-München, K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, C. Tigerstedt-Helsingfors, P. Trendelenburg-Freiburg i. Br., O. Warburg-Berlin, G. v. Wendt-Helsingfors, E. Widmark-Lund, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin, N. Zelinsky-Moskau

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertsiebenundsiebzigster Band

Viertes bis sechstes Heft

Abgeschlossen am 18. Oktober 1926

Berlin

Verlag von Julius Springer

1926

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in kurzer Folge zur Ausgabe gelangen; je sechs Hefte bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt ℳ 28,—.

In der Regel können Originalarbeiten nur Aufnahme finden, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Sie werden mit dem Datum des Eingangs versehen und der Reihe nach veröffentlicht, sofern die Verfasser die Korrekturen rechtzeitig erledigen. — Mitteilungen polemischen Inhalts werden nur dann zugelassen, wenn sie eine tatsächliche Richtigstellung enthalten und höchstens zwei Druckseiten einnehmen.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber,

Herrn Prof. Dr. C. Neuberg, Berlin-Dahlem, Hittorfstr. 18,

zu richten.

Das Honorar beträgt ℳ 40,— für den 16seitigen Druckbogen.

Die Verfasser erhalten bis 100 Sonderabdrucke ihrer Abhandlungen kostenfrei bis zu einem Umfang von $1^1/_2$ Druckbogen, von größeren Arbeiten nur bis 75. Doch bittet der Verlag, nur die zur tatsächlichen Verwendung benötigten Exemplare zu bestellen. Über die Freiexemplare hinaus bestellte Sonderdrucke werden berechnet. Die Herren Mitarbeiter werden jedoch in ihrem eigenen Interesse dringend gebeten, sich, wenn irgend möglich, mit der kostenfrei zur Verfügung gestellten Anzahl zu begnügen, und falls mehr Exemplare unbedingt erforderlich sind, deren Kosten vorher vom Verlage zu erfragen.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer
Berlin W 9, Linkstraße 23/24.

177. Band. Inhaltsverzeichnis. Heft 4/6.

Seite

Gutbier A.† und Berta Ottenstein. Eine Vorrichtung zur Dialyse von leicht oxydablen kolloid-dispersen Systemen 249

Redina, L. Über die Wechselwirkung der $Na^{\cdot}$-, $K^{\cdot}$- und $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionen in ihrem Einfluß auf das Gewicht der Tiere bei künstlicher Ernährung 253

Galwialo, M. J. Über das Ferment des Menschen- und Pferdeblutes und das Ferment der Keimscheibe des Hühnereies 266

Wladimiroff, G. E. Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. I. Mitteilung: Einige physikalisch-chemische Veränderungen des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier 280

Wladimiroff, G. E. und A. A. Schmidt. Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. II. Mitteilung: Zucker-, Rest- und Gesamtstickstoffgehalt im Eiereiweiß sich entwickelnder Hühnereier . . . 298

— — Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. III. Mitteilung: Zucker-, Fett- und Reststickstoffgehalt im Blute des Hühnerembryos 304

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe 3. Umschlagseite.

Eine Vorrichtung zur Dialyse von leicht oxydablen kolloid-dispersen Systemen.

Von

A. Gutbier † und Berta Ottenstein.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Universität Jena.)

(Eingegangen am 16. August 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die bei der Dialyse von leicht durch Luft zersetzlichen, hauptsächlich von leicht oxydablen kolloiden Lösungen vielfach auftretenden und mitunter recht großen, immer lästigen Schwierigkeiten lassen sich, wie vor einiger Zeit gezeigt worden ist[1]), in zahlreichen Fällen erfolgreich dadurch beheben, daß man die Reinigung derartiger empfindlicher Systeme unter flüssigem Paraffin oder einem sonst geeigneten reinen Öl — auch, nach dem Vorschlag von *S. M. Horsch*[2]), unter Vaseline — vornimmt und sich hierzu der in unserem Laboratorium gebräuchlichen „geschlossenen Dialysatoren"[3]) oder, wenn es sich um die Verarbeitung geringerer Flüssigkeitsmengen handelt, der Dialysiermembranen der Firma *Schleicher & Schüll* bedient. Dabei muß nicht allein das sogleich nach seiner Herstellung in den Dialysator gebrachte Material, sondern auch immer, also jedesmal bei der Erneuerung, das luftfreie Außenwasser mit der schützenden Schicht bedeckt werden, von der nach Beendigung der Dialyse die gereinigte Flüssigkeit für weitere Versuche leicht durch Ablassen im Scheidetrichter getrennt werden kann.

Man war mit einer solchen Versuchsanordnung in präparativer Hinsicht schon ein gut Stück vorwärts gekommen. Im Verlauf neuerer

---

[1]) *A. Gutbier*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **146**, 411, 1925.

[2]) Bull. soc. chim. (4) **27**, 778, 1920; vgl. *A. Gutbier*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **151**, 154, 1926.

[3]) *A. Gutbier* und *A. Mayer*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **121**, 215, 1922.

Untersuchungen aber haben wir feststellen müssen, daß einige ganz besonders empfindliche kolloide Lösungen, die wir im medizinischen Interesse bereitet haben, Schutzmittel der genannten oder einer ihr ähnlichen Art durchaus nicht vertragen. Durch diese Erkenntnis und durch die Notwendigkeit, Dialysen derartiger labiler Systeme doch durchführen zu müssen, sind wir veranlaßt worden, eine Vorrichtung zu schaffen, über die wir an Hand der schematischen Abb. 1 mit wenigen Worten berichten wollen.

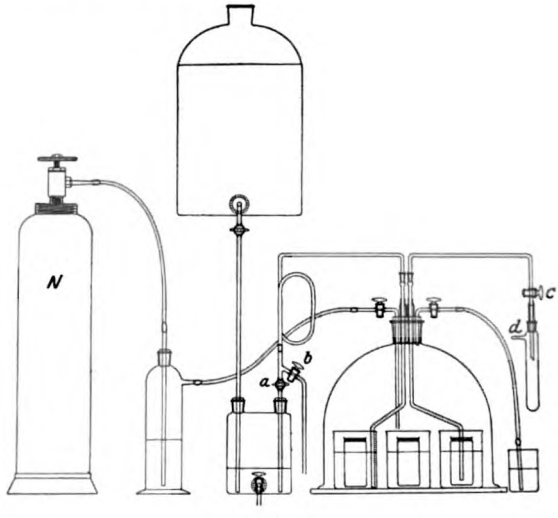


Abb. 1.

Eine unseren Zwecken entsprechende Apparatur muß nicht allein die *Erneuerung des Außenwassers*, sondern auch die *Entnahme von Proben der Innenflüssigkeit* oder *des gesamten Dialysatorinhalts* gestatten, *ohne daß die Systeme irgendwie mit Luft in Berührung kommen.* Infolgedessen haben wir die folgenden Anordnungen getroffen.

Wir benutzen unsere „offenen Dialysatoren“[1]) und stellen die mit den frisch bereiteten Präparaten beschickten Apparate in geeigneter Zahl und in der durch das weiter unten beschriebene Röhrensystem bedingten Anordnung auf eine Glasplatte unter eine geräumige und möglichst weit tubulierte Glocke, in der dann die Luft alsbald durch ein indifferentes Gas, zweckmäßig durch reinen Stickstoff, ersetzt wird. Platte und Glocke sind so sorgfältig aufeinander geschliffen, daß ein Hauch von Fett genügt, um dichten Verschluß zu sichern.

---

[1]) *A. Gutbier* und *A. Mayer*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **121**, 215, 1922.

Der Tubus der Glasglocke ist ausgefüllt durch einen Gummistopfen mit vier Bohrungen. Von diesen nimmt eine das bis zur Platte hinunterreichende, mit einem Hahn versehene Gaseinleitungsrohr auf. In den drei anderen Bohrungen finden sich kurze, unmittelbar unter dem Stopfen abgerundete Glasröhren, deren eine, gebogen und wiederum durch einen Hahn abschließbar, für die Ableitung des verdrängten Gases durch ein mit Wasser gefülltes, gleichzeitig mit als Blasenzähler dienendes Gefäß sorgt und auch mittels der aus der Abbildung ersichtlichen Schlauch- und Glasverbindung Anschluß an eine Gasbürette für analytische Zwecke unmittelbar ermöglicht. Die beiden letzten Rohrstutzen, außerhalb der Glocke je mit einem kurzen Stück Gummischlauch überzogen, sind Führungen für zwei, unten entsprechend gebogene und oben in Schliffe endigende Glasröhren, die beide in den Führungen drehbar sein müssen und durch die Schliffe mit den Nebenapparaten in Verbindung stehen.

Die eine Röhre ermöglicht die Erneuerung des Außenwassers in den Dialysatoren unter Ausschluß von Luft und ist so geformt, daß sie in der durch die Versuche gegebenen beliebigen Reihenfolge in den Zwischenraum zwischen Pergamentpapiersack und Wandung aller der unter der Glocke in geeigneter Weise ausgestellten Gläser glatt eingeführt werden kann. Sie ist durch den Schliff und ein Rohr, das eine als Heber dienende, durch einen Hahn verschließbare und mit einem längeren Gummischlauch versehene Abzweigung trägt, mit einer Druckflasche und durch diese mit einem entsprechend hoch gestellten Wasserbehälter verbunden. Ebenso wie die Druckflasche vor Beginn des Versuchs vollständig mit dem indifferenten Gas gefüllt wird, steht das ausgekochte und unter Luftabschluß erkaltete Wassers in dem größeren Behälter unter dem gleichen Gas; dieser Teil unserer Apparatur ist, weil allgemein bekannt und für ähnliche Zwecke gebräuchlich, in der Abbildung nicht mitgezeichnet worden.

Die zweite Röhre endlich dient zur Entnahme von Proben der Innenflüssigkeiten oder auch zur Überführung des gesamten Inhalts der Dialysatoren unter Luftabschluß durch das eingeschliffene Rohr in Glasgefäße, die an das Hahnstück *c* angeschliffen sind. Auch sie hat eine besondere Form erhalten, so daß sie ohne Schwierigkeit und in beliebiger Reihenfolge durch den Ring eines jeden unter der Glocke befindlichen Pergamentpapiersacks in die Innenflüssigkeiten eingetaucht werden kann.

Die *Erneuerung des Außenwassers* erfolgt so, daß die hierfür in Betracht kommende Glasröhre in die aus der Abbildung ersichtliche Stellung gebracht und, *während Stickstoff* langsam durch die Apparatur *strömt*, bei geschlossenen Hähnen *a* und *c* der Hahn *b* geöffnet wird.

Der Heber bewirkt Entleerung des Außengefäßes. Man schließt Hahn *b* in dem Augenblick, in dem ihn die letzten Tropfen der Flüssigkeit durchlaufen, öffnet den Hahn des größeren Wasserbehälters und Hahn *a* und läßt die nötige Menge von reinem Wasser ein.

Zur *Entnahme von Proben der Innenflüssigkeiten* oder *des Gesamtinhalts der Dialysatoren* wird die dafür in Betracht kommende zweite Glasröhre in die aus der Abbildung ersichtliche Stellung gebracht und das bei *c* angeschliffene Gefäß durch *d* mit Hilfe einer Wasserstrahlluftpumpe leicht evakuiert. Dann wird, *während* wiederum *Stickstoff* langsam die Apparatur *durchströmt*, bei geschlossenen Hähnen *a* und *b* der Hahn *c* so lange geöffnet, bis die gewünschte Menge der Flüssigkeit übergegangen ist.

Über die Wechselwirkung der $Na^{\cdot}$-, $K^{\cdot}$- und $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionen in ihrem Einfluß auf das Gewicht der Tiere bei künstlicher Ernährung.

Von

L. Redina.

(Aus dem Institut für Ernährungsphysiologie des Volksgesundheitskommissariats in Moskau.)

(Eingegangen am 17. Juli 1926.)

Mit 22 Abbildungen im Text.

Es ist eine lang bekannte Tatsache, daß die Mineralsalze zu den unentbehrlichen Bestandteilen der Nahrung gehören; bis jetzt wurde jedoch noch nicht ermittelt, wie groß das wirkliche Salzbedürfnis des Organismus ist. Der Salzgehalt der Nahrung kann innerhalb sehr weiter Grenzen schwanken; Tiere, die sich manchmal mit geringen Quantitäten irgend eines Salzes begnügen, bedürfen in anderen Fällen sehr großer Mengen desselben.

Gegen Ende des vorigen Jahrhunderts vertrat *Bunge* (1) die Ansicht, das Kochsalzbedürfnis des Tieres sei von dem Gehalt der Kost an Kalisalzen abhängig.

Die Lehre vom Ionenantagonismus gibt uns die Möglichkeit, die Frage nach der Bedeutung der Nährsalze von einem neuen Gesichtspunkt aus zu untersuchen. Durch die Arbeiten von *Loeb*, *Ostwald*, *Neuschlosz* und vielen anderen wurde erwiesen, daß bei einer großen Anzahl biologischer Erscheinungen das Verhältnis der antagonistischen Ionen eine größere Bedeutung besitzt, als deren absolute Konzentration. Die weiteren Untersuchungen waren darauf gerichtet, den Zusammenhang des Ionengleichgewichts mit den physiologischen Grundprozessen, z. B. der Herzkontraktion, der Nervenerregung usw. aufzudecken. Die Arbeiten von *Bunge*, *Händel* (2), *Tsukamoto* (3), *Asada* (4), *Tadenuma* (5) von der Notwendigkeit der Zellsalze in der Kochsalz enthaltenden Kost für die Erhaltung des Körpergewichts und des Stickstoff- und Gaswechsels geben uns Grund zu der Annahme, daß die in der Nahrung enthaltenen Mengen verschiedener Ionen gleichfalls in einem bestimmten Verhältnis zueinander stehen müssen.

Die vorliegende Arbeit gilt dem Studium dieser Frage, und zwar in bezug auf drei Kationen: $Na^{\cdot}$, $K^{\cdot}$ und $Ca^{\cdot\cdot}$.

Methodik.

Die Notwendigkeit, die Experimente gleichzeitig an einer großen Zahl von Tieren anzustellen, schloß die Möglichkeit der Untersuchung des Stoffwechsels und der Blutzusammensetzung aus; den Zustand der Tiere konnten wir nur auf Grund ihres Gewichts und ihrer Lebensdauer beurteilen. Die Versuche wurden an weißen Mäusen, erwachsenen Männchen von 20 bis 30 g Gewicht, angestellt. Um den Einfluß äußerer Faktoren, z. B. der Temperaturschwankungen, der verschiedenen Zusammensetzung der Milch usw., auszuschließen, wurden in sämtlichen Fällen nur die Ergebnisse der parallel ausgeführten Versuchsreihen miteinander verglichen. Als Nahrung diente Casein, das aus der Milch zusammen mit dem Fett mittels Essigsäure ausgefällt und durch Dekantieren bis zur neutralen Reaktion ausgewaschen wurde; das derart (nach *Lunin*) präparierte Casein enthielt nur Spuren von Asche. Dieses Casein wurde den Mäusen in feuchtem Zustande verabreicht und von ihnen gern gefressen. Infolge seiner feuchten Beschaffenheit wurde nur wenig davon im Käfig verstreut, wodurch sich die tägliche Berechnung des verbrauchten Futters sehr erleichterte. Der Einfluß verschiedener Feuchtigkeitsgrade des Futters an verschiedenen Tagen wurde dadurch ausgeschlossen, daß sämtliche Mäuse jeden Tag das Futter aus dem gleichen Gemisch erhielten. Zum Trinken wurde destilliertes Wasser verabreicht. Bei einer derartigen Ernährung begannen die Mäuse nach Verlauf von 28 bis 30 Tagen sehr schnell an Gewicht abzunehmen, um darauf in kurzer Zeit zugrunde zu gehen. Die Versuche mit den verschiedenen Salzgaben mußten infolgedessen so angestellt werden, daß die Resultate nicht später als nach 23 Tagen scharf zu erkennen waren. Aus den gleichen Gründen war es nicht möglich, die Wirkung der Salze in kleinen Dosen, d. h. während einer längeren Zeitperiode zu ermitteln. Erhielten die Tiere große Mengen Salzgemisch (0,13, 0,25 und 0,38 g pro Tag), so war gewöhnlich schon nach 14 Tagen ein ziemlich deutlicher Unterschied im Verlauf der Gewichtskurven zu bemerken. Die Salze wurden stets als Chloride verabreicht; da die Gesamtmenge der Salze in den Parallelversuchen immer die gleiche war, so schwankten die zugeführten Cl-Mengen nur unbeträchtlich. Wie aus den Tabellen I und II ersichtlich ist, besteht kein Zusammenhang zwischen den Futtermengen, die von den Tieren bei Verabreichung verschiedener Salzgemische durchschnittlich pro Tag aufgenommen wurden, und der Gewichtsabnahme.

Tabelle I.

Versuchsdauer 23 Tage.

Tägliche Dosis KCl g	Ausgangsgewicht g	Aufgenommen pro Tag		Gewichtsabnahme Proz.
		durchschnittl.	pro g Körpergewicht	
0,25	21	7,0	0,33	32
0,20	25	6,5	0,26	27
	23	6,0	0,26	26
0,13	24	7,0	0,26	19
	24	7,5	0,30	20
0,08	28	7,5	0,27	15
	27	7,3	0,27	17
0,03	21	6,5	0,31	10
	26	6,6	0,25	14

Zu Beginn unserer Untersuchung stellten wir Vorversuche an über die Ernährung der Tiere mit Casein ohne Salzzugabe, um den Verlauf der Gewichtsabnahme unter diesen Bedingungen zu verfolgen. Innerhalb 12 Tagen verloren zehn Mäuse durchschnittlich 15 Proz. ihres Anfangsgewichts, nach 25 Tagen erreichte der Gewichtsverlust 25 Proz.

Tabelle II.

Versuchsdauer 23 Tage.

Totale Salzmenge (NaCl + KCl) 0,13 g pro Tag.

Na : K	Ausgangsgewicht g	Aufgenommen pro Tag: durchschnittl.	Aufgenommen pro Tag: pro g Körpergewicht	Gewichtsabnahme Proz.
1 : 1/20	25	6,0	0,24	8
	21	5,0	0,24	15
1 : 1/10	23	6,0	0,26	12
	25	7,0	0,28	11
1 : 1/5	20	7,0	0,35	11
	21	7,0	0,27	7
1 : 1/2	23	6,0	0,26	24
	27	7,0	0,26	20
1 : 1	23	6,5	0,28	20
	30	6,0	0,20	27
1/5 : 1	26	6,0	0,23	8
	30	5,7	0,20	15
1/10 : 1	30	6,7	0,22	19
	24	6,0	0,25	23
1/20 : 1	21	5,0	0,24	21

Die Versuche über die Wirkung der einzelnen Salze NaCl, KCl und $CaCl_2$ ergaben, daß die Erhöhung der Dosis bis auf 0,13 g pro Tag einen beträchtlichen Gewichtsverlust hervorrief, während 0,38 g KCl oder $CaCl_2$ bereits tödlich wirkten. (Siehe Tabelle III, Abb. 1, 2 und 3.)

Tabelle III.

Tägliche Dosis	NaCl		KCl			$CaCl_2$	
	Gewichtsabnahme in Proz. des Ausgangsgewichts						
g	I	II	I	II	III	I	II*)
0,38	28	32	Exitus am 3. bis 6. Tag			—	—
0,25	32	20	26	27	—	Exitus am 3. bis 6. Tag	
0,20	20	27	18	20	21	25	35
0,13	20	26	19	18	20	21	24
0,08	15	19	15	17	—	20	20
0,03	17	16	10	14	—	9	19
	Versuchsdauer: 23 Tage					16 Tage	

*) Die römischen Ziffern bezeichnen die Nummern der Tiere.

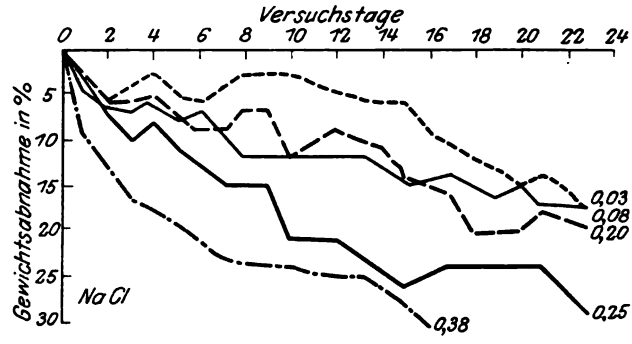


Abb. 1.

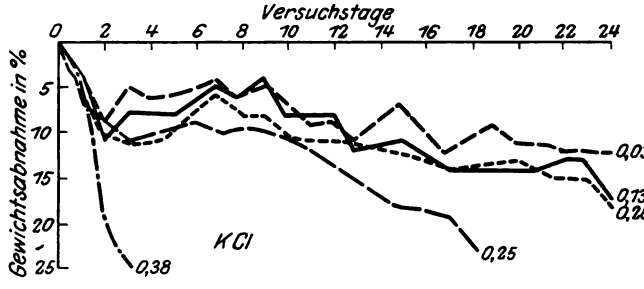


Abb. 2.

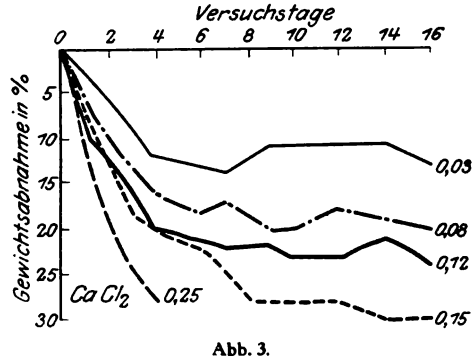


Abb. 3.

In den folgenden Versuchen sollte folgendes festgestellt werden:

1. Ob sich der Zustand der Tiere verbessern und die Gewichtsabnahme hintanhalten läßt, wenn zu der Nahrung, die eine beträchtliche Menge irgend eines Salzes enthält, ein Salz mit einem anderen Kation hinzugefügt wird.

2. Bei welchem Verhältnis beider Kationen die geringste Gewichtsabnahme zu konstatieren ist.

Wir wandten folgende Ionenkombinationen an: 1. $Na^+ + K^+$, 2. $Ca^{++} + K^+$, 3. $Ca^{++} + Na^+$ und 4. $Ca^{++} + (Na^+ + K^+)$. Bei den Versuchen mit dem ersten Salzgemisch (NaCl + KCl) wurde dieses in acht verschiedenen Äquivalenzverhältnissen bereitet: (Na : K) — 1. 1 : $^1/_{20}$, 2. 1 : $^1/_{10}$, 3. 1 : $^1/_5$, 4. 1 : $^1/_2$, 5. 1 : 1, 6. $^1/_5$: 1, 7. $^1/_{10}$: 1, 8. $^1/_{20}$: 1. Für jedes Ionenverhältnis wurden sieben Mäuse genommen; von diesen erhielten zwei (I und II) pro Tag 0,13 g des Salzgemisches, drei (III, IV und V) 0,25 g und zwei (VI und VII) 0,38 g (s. Tabelle IV, Abb. 4, 5 und 6).

Tabelle IV.

Versuchsdauer 23 Tage.

Na : K	0,13 g des Salzgemisches pro Tag		0,25 g des Salzgemisches pro Tag			0,38 g des Salzgemisches pro Tag	
	Gewichtsabnahme in Proz. des Ausgangsgewichts						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
1 : $^1/_{20}$	8	15	22	27	21	27	27
1 : $^1/_{10}$	12	11	21	23	23	24	31
1 : $^1/_5$	11	7	10	10	7	16	7
1 : $^1/_2$	24	20	26	26	32	29	36
1 : 1	20	27	23	21	23	29	tot
$^1/_5$: 1	8	15	19	20	18	17	25
$^1/_{10}$: 1	19	23	23	22	18	22	16
$^1/_{20}$: 1	—	21	20	28	30	tot	26

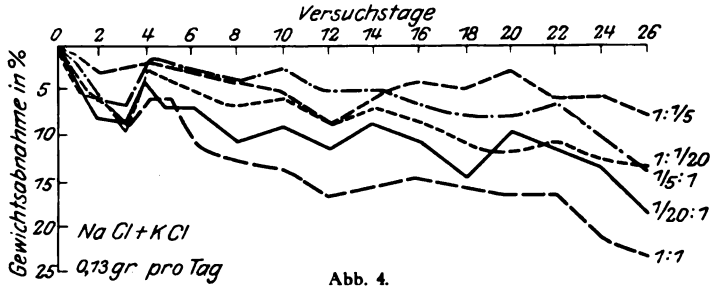


Abb. 4.

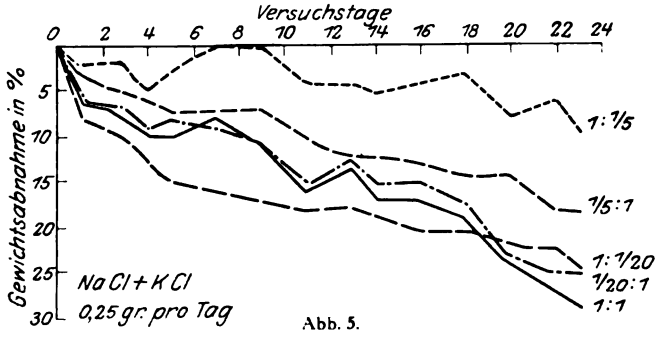


Abb. 5.

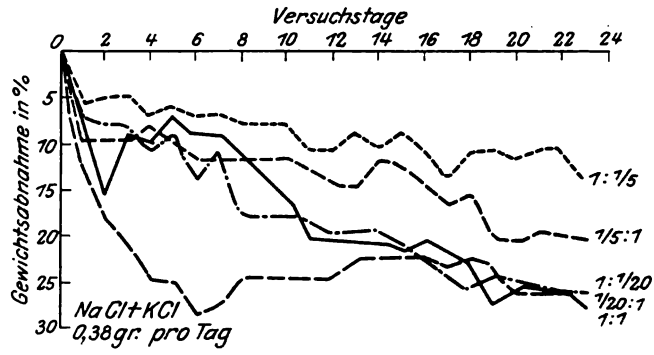


Abb. 6.

Die geringste Gewichtsabnahme konnte beim Verhältnis Na : K = 1 : $^1/_5$ beobachtet werden; mit diesen Kurven stimmte am besten der Kurvenverlauf von Na : K = $^1/_5$: 1 überein; beim Verhältnis 1 : 1 und 1 : ½ tritt stets eine Verschlimmerung im Zustand der Tiere ein.

Die Versuchsergebnisse mit dem Salzgemisch NaCl + KCl sind gleichfalls in den Abb. 7, 8 und 9 wiedergegeben. Die Ordinatenhöhe entspricht

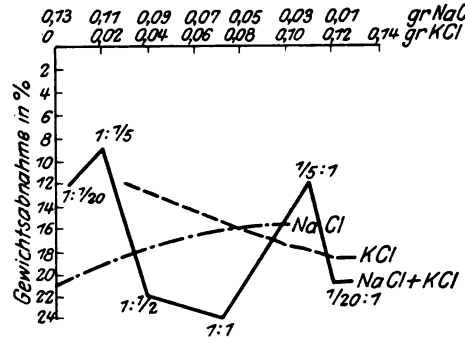


Abb. 7.

hier, wie auch auf den früheren Kurven, derjenigen Gewichtsabnahme des Tieres, die am letzten Versuchstage festgestellt wurde. Die Abszissen bezeichnen die verschiedenen Konzentrationen von KCl und NaCl. Die Durchschnittszahlen der Tabelle III ergaben die Kurven, die den einzelnen Salzen entsprechen. Berechnet man aus den Versuchen mit dem Salzgemisch NaCl + KCl diejenigen Mengen von NaCl und KCl, welche die Tiere bei verschiedenen Na : K-Verhältnissen eingenommen haben, und zieht man die Ordinaten den Durchschnittswerten der Tabelle IV entsprechend, so erhält man für die Dosen 0,13, 0,25 und 0,38 g je eine Kurve. Beim Vergleich dieser Kurven mit denjenigen der einzelnen Salze ergibt sich, daß unabhängig von der Konzentration der Salze die $Na^{\cdot}$- und $K^{\cdot}$-Ionen in allen Fällen, in denen das Verhältnis Na : K gleich 1 : $^1/_5$ oder $^1/_5$: 1 ist, als Antagonisten wirken.

Aus den Kurven (Abb. 4, 5 und 6) geht hervor, daß die Herabsetzung der Gesamtsalzmenge für die Tiere günstig ist. Die Versuche mit noch

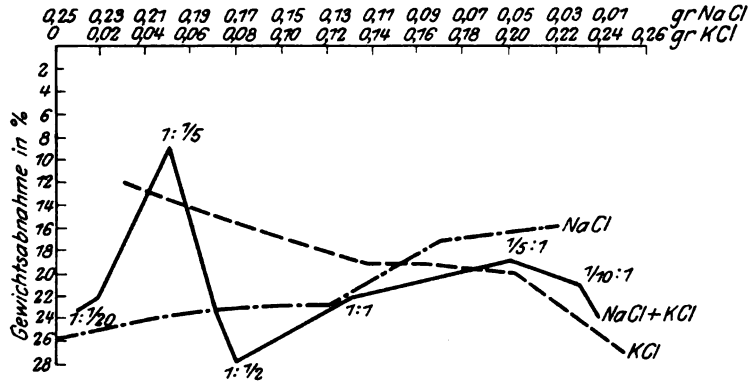


Abb. 8.

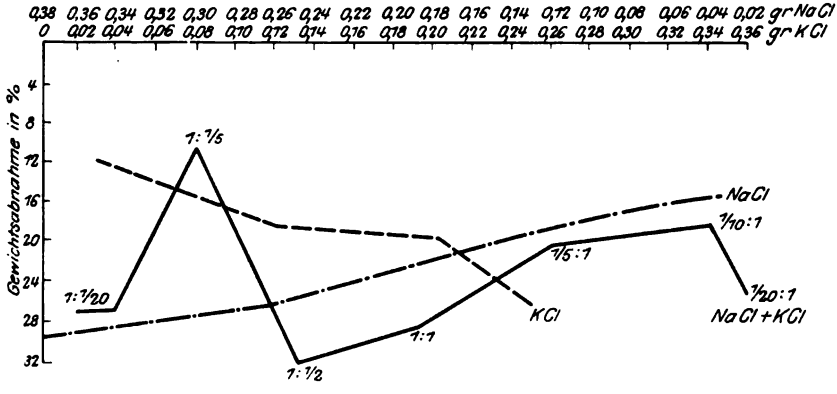


Abb. 9.

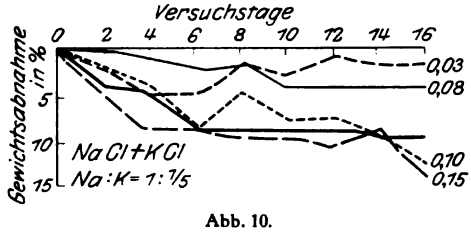


Abb. 10.
Die ausgezogene Linie zeigt die Gewichtsabnahme bei salzfreier Nahrung.

kleineren Dosen unter Beibehaltung des Verhältnisses Na : K = 1 : 1/5 ergeben eine noch geringere Gewichtsabnahme (Abb. 10). Diese Untersuchungen konnten aber nicht fortgesetzt werden, da unter den erwähnten Fütterungsverhältnissen eine Verlängerung der Versuche unmöglich war.

Die folgenden Versuche mit dem Salzgemisch $CaCl_2 + KCl$ ergaben andere Resultate (Tabelle V, Abb. 11, 12 und 13).

Tabelle V.

Ca : K	Versuchsdauer: 16 Tage 0,15 g des Salzgemisches pro Tag				Versuchsdauer: 13 Tage 0,20 g des Salzgemisches pro Tag				Versuchsdauer: 16 Tage 0,25 g des Salzgemisches pro Tag			
	Gewichtsabnahme in Proz. des Ausgangsgewichts											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
1 : 1/20	31	Exitus am 5. bis 7. Tag			35	**)	Exitus am 7. bis 12. Tag		—	—	—	—
1 : 1/5	24	30	32	*)	28	27			—	—	—	—
1 : 1	10	26	25	15	33	28	34	—	***)	39	—	—
1/5 : 1	11	13	15	16	14	15	24	20	21	31	37	30
1/20 : 1	15	22	18	21	23	21	—	—	24	33	19	—
KCl	—	—	—	—	20	22	—	—	24	29	—	—

*) Exitus am 16. Tag. — **) Exitus am 12. Tag. — ***) Exitus am 7. Tag.

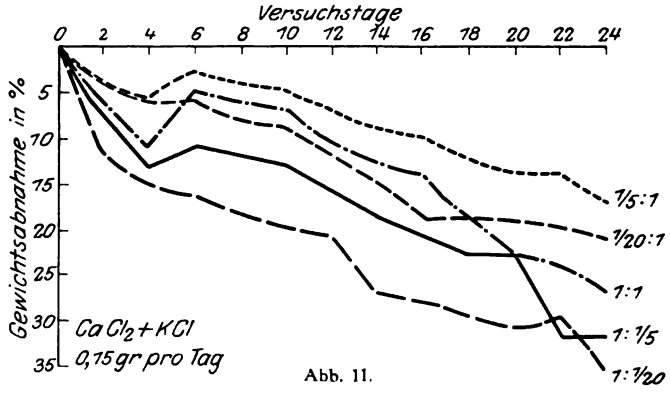


Abb. 11.

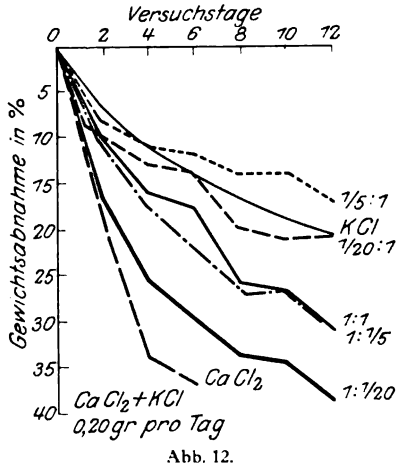


Abb. 12.

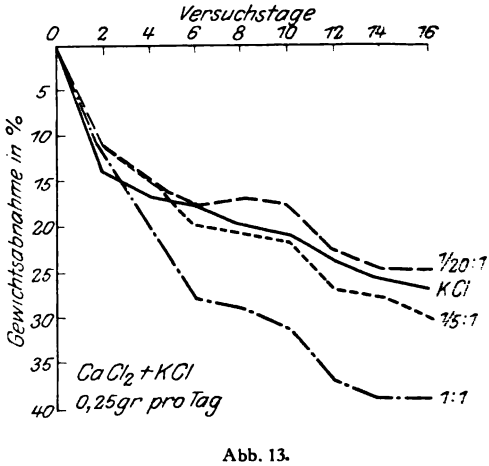


Abb. 13.

Die Tiere verloren an Gewicht und gingen desto schneller zugrunde, je reicher das Futter an $CaCl_2$ war. Bei Verabreichung von Salzgemischen mit dem Verhältnis Ca : K gleich $^1/_{20} : 1$, oder nur von KCl, nahm das Gewicht der Tiere stärker ab, als beim Verhältnis $^1/_5 : 1$. Dieser Umstand

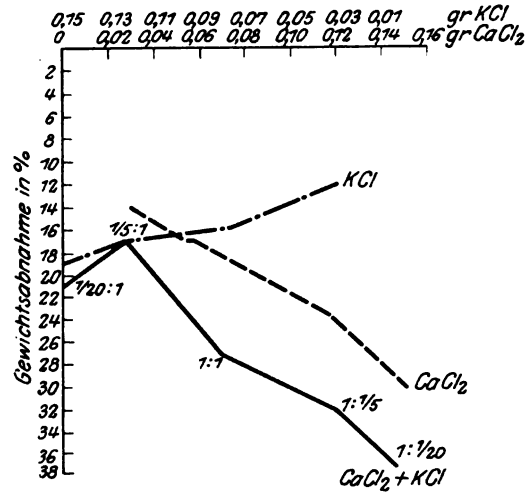


Abb. 14.

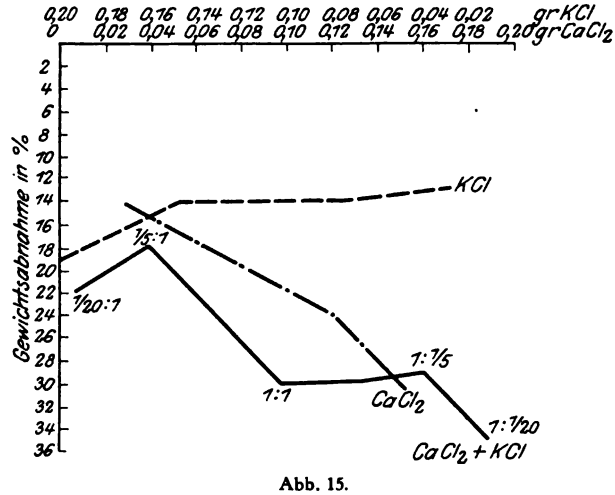


Abb. 15.

kann vielleicht der schädigenden Wirkung steigender KCl-Dosen zugeschrieben werden.

Aus den Abb. 14, 15 und 16 ist ersichtlich, daß der Zusatz von KCl keine Abschwächung der schädlichen $CaCl_2$-Wirkung hervorrief. Sämtliche Punkte der Ca + K-Kurven liegen niedriger als die $CaCl_2$-Kurve.

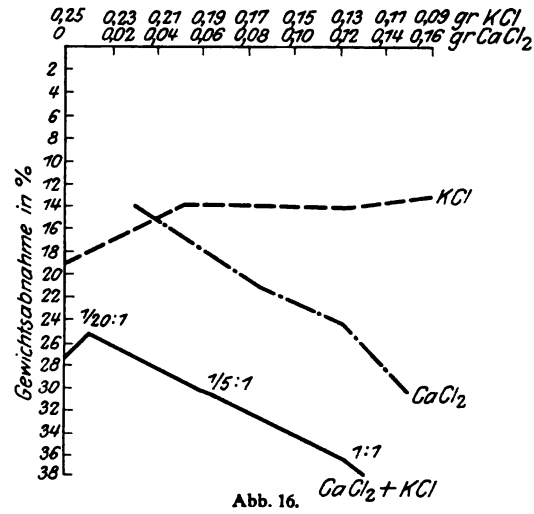


Abb. 16.

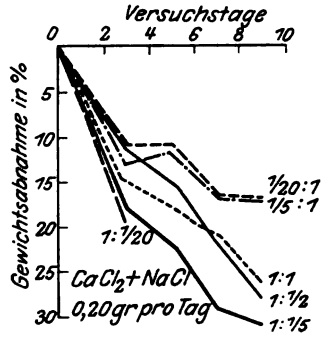


Abb. 17.

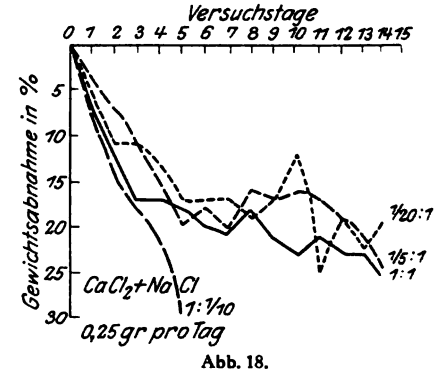


Abb. 18.

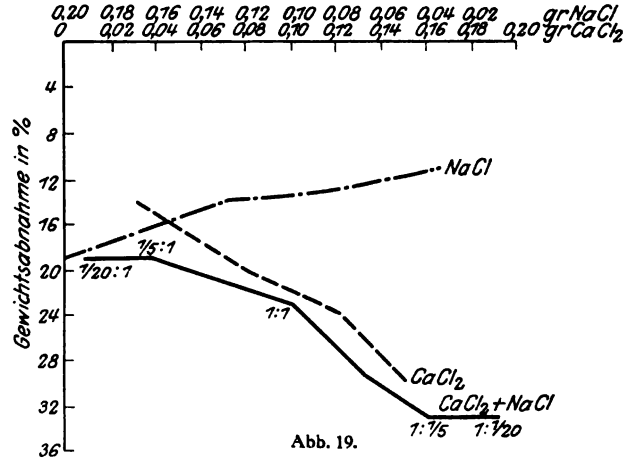


Abb. 19.

Für die Gemische von $CaCl_2 + NaCl$ (Tabelle VI, Abb. 17, 18, 19 und 20) konnte gleichfalls kein Ionenantagonismus festgestellt werden.

Tabelle VI.

Ca : Na	Versuchsdauer: 10 Tage 0,20 g des Salzgemisches pro Tag				Versuchsdauer: 14 Tage 0,25 g des Salzgemisches pro Tag	
	Gewichtsabnahme in Proz. des Ausgangsgewichts					
	I	II	III	IV	V	VI
$1 : {}^1/_{20}$	31	Exitus am 5. Tag		—	—	—
$1 : {}^1/_5$	Exitus	36	31	27	—	—
1 : 1	28	*)	24	22	32	25
$^1/_2 : 1$	—	—	—	—	28	28
$^1/_5 : 1$	16	19	17	24	20	28
$^1/_{20} : 1$	19	14	24	—	13	21

*) Exitus am 7. Tag.

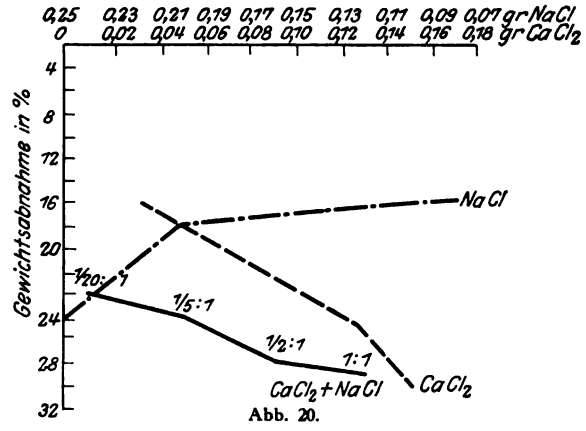


Abb. 20.

Bei der Untersuchung des Salzgemisches $Ca^{\cdot\cdot} + (Na^{\cdot} + K^{\cdot})$ wurden NaCl und KCl in solchen Mengen genommen, daß das Verhältnis Na : K gleich $1 : {}^1/_5$ war. Aus den Abb. 21 und 22 und der Tabelle VII ersieht man

Tabelle VII.

$\frac{Ca}{Na + K}$	Versuchsdauer: 18 Tage 0,20 g des Salzgemisches pro Tag			
	Gewichtsabnahme in Proz. des Ausgangsgewichts			
	I	II	III	IV
$1 : {}^1/_{20}$	*)	37	35	—
$1 : {}^1/_5$	35	30	30	***)
1 : 1	**)	34	27	26
$^1/_5 : 1$	9	5	15	10
$^1/_{20} : 1$	14	13	17	1
Na + K	7	14	—	—

*) Exitus am 7. Tag. — **) Exitus am 10 Tag. — ***) Exitus am 13. Tag.

wiederum, daß kein Ionenantagonismus besteht. So zeigt sich also, daß in unseren Versuchen die Erscheinung des vielfach bei den verschiedensten biologischen Prozessen beschriebenen Ionenantagonismus zwischen $Ca^{\cdot\cdot}$ und $K^{\cdot}$, $Ca^{\cdot\cdot}$ und $Na^{\cdot}$, nicht beobachtet werden konnte.

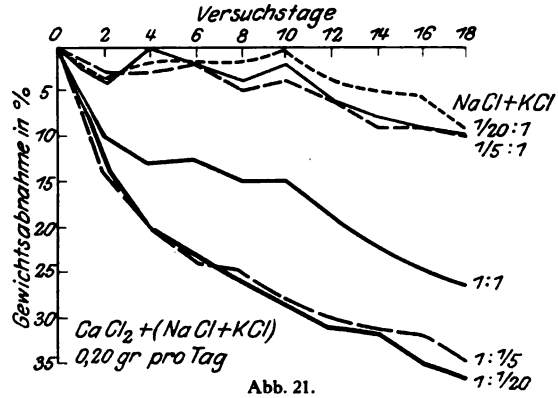


Abb. 21.

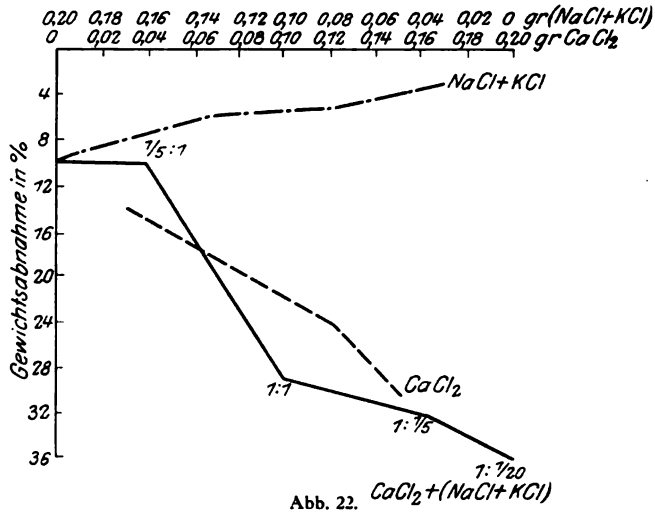


Abb. 22.

Erwähnung finden sollen noch unsere Versuche, $Na^{\cdot}$ und $K^{\cdot}$ durch Li zu ersetzen. Zwei Mäuse, die täglich 0,2 g NaCl erhielten, verloren im Verlauf von 13 Tagen je 21 Proz. ihres Anfangsgewichts; die gleiche Menge des einen Gemisches (NaCl + LiCl) im Verhältnis $Na^{\cdot} : Li^{\cdot} = 1 : 1/8$ führte in einem Falle nach 8 Tagen zum Tode, in einem anderen Falle zu einer Gewichtsabnahme von 38 Proz. Die Hinzufügung von LiCl zu KCl führte ebenfalls zum Untergang der Tiere am achten und am vierten Tage. Der Zusammenhang zwischen den $Na^{\cdot}$- und $K^{\cdot}$-Ionen ist nämlich für diese beiden Ionenarten charakteristisch, und es kann kein Gleichgewicht bei Ersatz eines dieser Ionen durch $Ca^{\cdot\cdot}$ oder $Li^{\cdot}$ erreicht werden.

Die Berechnung des Verhältnisses $Na^{\cdot} : K^{\cdot}$ in den von den oben angeführten Autoren gebrauchten Gemischen ergibt, daß dieses Verhältnis bei *Händel* und *Tsukamoto* gleich $1 : {}^1/_5$, bei *Tadenuma* und *Asada* gleich $1 : {}^1/_6$ war.

Händel und *Tadenuma* erklären die Ergebnisse ihrer Versuche durch das Bedürfnis des Organismus nach Zellsalzen, *Asada* durch das Bedürfnis nach Kalisalzen. Man könnte annehmen, daß dieses Bedürfnis durch die Anwesenheit von NaCl in der Kost bedingt war und daß die Hinzufügung der Salzgemische zu einer Hemmung der Gewichtsabnahme und Erhöhung des Stickstoffumsatzes und des Gaswechsels führte, dadurch, daß das für den Organismus unentbehrliche Verhältnis zwischen $K^{\cdot}$ und $Na^{\cdot}$ hergestellt wurde.

Zum Schluß möchte ich auch hier Herrn Professor Dr. *M. Schaternikoff* meinen tiefsten Dank für seine stetige Hilfe aussprechen.

Zusammenfassung.

1. Der Zusatz von KCl zu NaCl enthaltender Kost in solchen Mengen, die ein $Na^{\cdot}/K^{\cdot}$-Verhältnis gleich $1 : {}^1/_5$ herbeiführen, verbessert den Zustand der Tiere und hemmt die Gewichtsabnahme. Dieselben Erfolge werden erzielt bei Hinzufügung von NaCl zu KCl enthaltender Nahrung, wenn das $K^{\cdot}/Na^{\cdot}$-Verhältnis gleich $1 : {}^1/_5$ wird. In den Fällen, wo das Verhältnis $Na^{\cdot}/K^{\cdot}$ gleich $1 : {}^1/_{20}$, $1 : ½$, $1 : 1$ und ${}^1/_{20} : 1$ war, tritt starke Gewichtsabnahme ein.

2. Die günstige Wirkung der Salzgemische mit dem $Na^{\cdot}/K^{\cdot}$-Verhältnis gleich $1 : {}^1/_5$ auf den Organismus hängt nicht von den absoluten Mengen der $Na^{\cdot}$- und $K^{\cdot}$-Ionen, sondern nur von deren Verhältnis ab, denn diese Wirkung wurde immer erzielt, wenn die absoluten Mengen um die zwei- bis dreifache Menge verändert wurden.

3. Bei der Verwendung der Gemische $CaCl_2 + KCl$, $CaCl_2 + NaCl$ und $CaCl_2 + NaCl + KCl$, konnte kein Antagonismus festgestellt werden. Die Gewichtsabnahme ging in diesen Fällen der Vergrößerung der $CaCl_2$-Mengen parallel, wie in den Versuchen, wo nur $CaCl_2$ gegeben wurde.

Literatur.

1) *Bunge*, Lehrbuch d. Physiol. d. Menschen, Bd. 2. — 2) *Händel*, diese Zeitschr. **146**, 1924. — 3) *Tsukamoto*, diese Zeitschr. **151**, 216, 1924. — 4) *Asada*, ebendaselbst **140**, 326, 1924. — 5) *Tadenuma*, ebendaselbst **145**, 481, 1924.

Über das Ferment des Menschen- und Pferdeblutes und das Ferment der Keimscheibe des Hühnereies[1]).

Von

M. J. Galwialo.

(Aus dem Laboratorium für physiologische Chemie an der militär-medizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 7. August 1926.)

Die Frage nach der chemischen Natur der Fermente ist bis jetzt noch nicht geklärt. Die meisten Forscher sind der Ansicht, daß die Fermente eiweißähnliche Körper vorstellen (*Heidenhain, Osborne, Buchner, Loew*), einige Autoren sprechen ihnen Kohlehydratcharakter zu (*Hirschfeld, Bertrand*), andere wieder nehmen eine Verwandtschaft mit Lipoiden an. Auf Grund seiner letzten Untersuchungen hält *Willstätter* die Fermente für Stoffe sui generis. Insoweit die chemische Natur der Fermente unbekannt ist, haben wir auch kein einwandfreies Verfahren für ihre Isolierung aus den Verdauungsdrüsen und deren Säften sowie aus anderen Geweben und Flüssigkeiten des Organismus. In unseren seit dem Jahre 1910 (noch im Laboratorium von *A. Danilewski* und *M. Iljin*) ausgeführten Fermentarbeiten steckten wir uns das Ziel, das Enzym als solches zu isolieren oder wenigstens in möglichst reiner Form zu gewinnen. Wir möchten hier die Beobachtungen und Resultate, die wir bisher erhalten haben, mitteilen.

Über den ersten Teil unserer Ergebnisse ist bereits in der Abhandlung „Zur Frage nach der Photosynthese der Kohlehydrate" (diese Zeitschr. 158, 1925) berichtet worden. Die Resultate der Isolierung des Ferments (Fermente) aus dem Speichel, dem Magen-, Pankreas- und Darmsaft, die nach der *Pawlow*schen Methode erhalten wurden, sowie aus dem Sperma und dem Harn wurden in der Sitzung der Physiologischen Gesellschaft am 29. März 1923 mitgeteilt und in der Wratschebnaja Gaseta 1924, Nr. 5 veröffentlicht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung des Ferments aus dem

---

[1]) Mitgeteilt auf dem zweiten allrussischen Kongreß der Physiologen am 25. Mai 1926.

Blute des Menschen und des Pferdes und aus der Keimscheibe des Hühnereies und ist dem Studium desjenigen Elektrolytmediums (Cofermente) gewidmet, bei dem das von uns isolierte Ferment diese oder jene Wirkung entfalten kann. Das Blut führt der Zelle die Baustoffe aus dem Verdauungstraktus zu. Die Zelle verfügt über mannigfaltige komplizierte Prozesse der Synthese und des Abbaues, die mit Hilfe eines organischen Katalysators, eines Ferments (Fermente) und der Elektrolyte (Cofermente) zustande kommen. Man muß annehmen, daß im Blute, das den Inhalt verschiedener Zellen aufnimmt, viele organische Katalysatoren oder mindestens einer vorhanden ist, der viele Funktionen erfüllt. Das Blut erscheint als jener lebendige Strom, der den Zellen unseres Körpers ununterbrochen Baumaterialien zuführt und abgebaute Substanzen nach komplizierten chemischen Umsetzungen in der Zelle wieder fortführt.

Methodik.

Isolierung des Ferments aus dem Blute.

Wir stellten uns zur Hauptaufgabe, eine Methode zur Isolierung des Ferments bei seiner geringsten Denaturation aufzufinden. In der Literatur sind viele Methoden zur Isolierung des Ferments angegeben, aber sie befriedigten uns nicht, da das Ferment bei der Abscheidung nach diesen Vorschriften 50 bis 60 Proz. seiner Aktivität verliert.

Zur Isolierung des Ferments wird das Pferde- oder Menschenblut aus dem Blutgefäß in einen Zylinder mit oxalsaurem Natrium (0,12 g auf 100 ccm Blut) gebracht und in eine Kältemischung oder auf Eis gestellt, um die Formelemente zum Absitzen zu bringen. Darauf wird das Plasma abgegossen und zentrifugiert, um den Rest der Formelemente zu entfernen. Ferner goß man 100 ccm des Plasmas in einen hohen Zylinder und verdünnte es mit 10 bis 15 Volumina destillierten Wassers. Der Zylinder wurde nun in eine Kältemischung bei — 4 bis — 6° C gestellt und durch das verdünnte Plasma während 5 bis 10 Minuten in langsamem Strome Kohlensäure geleitet; die Flüssigkeit wurde dabei schwach trübe. Darauf brachte man den Zylinder auf 24 Stunden in die Kältemischung bei 0°. Während dieser Zeit bildete sich auf dem Boden des Zylinders ein kleiner, zäher, weißer Niederschlag. Diese Fällung wurde mehrmals mit Eiswasser ausgewaschen. Auf den ausgewaschenen Niederschlag goß man etwa 10 bis 15 ccm destillierten Wassers und stellte die Flüssigkeit zum Gefrieren auf 24 Stunden in die Kältemischung. Beim Trocknen dieses Niederschlags bei 110° C bis zur Gewichtskonstanz schwankt seine Menge von 0,22 bis 0,25 g auf 100 g Plasma oder 200 g Blut.

Nach Abscheidung des Niederschlags besitzt das Plasma keine fermentativen Eigenschaften mehr. Wir sind daher zu der Annahme berechtigt, daß das gesamte Ferment durch den oben beschriebenen Niederschlag mitgerissen worden ist. Wir wollen den letzteren infolgedessen „das Grundferment" nennen. Um das Ferment zu seiner Abscheidung in den dispersoiden Zustand überzuführen, wurde der gefrorene Niederschlag sodann nach 24stündigem Stehen auf folgende Weise bearbeitet.

Die Fällung wurde mit einer kleinen Menge kohlensäuregesättigten Wassers versetzt, mit Quarz zerrieben und darauf die Flüssigkeit vom Niederschlag durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Niederschlag wurde wiederholt in dieser Weise bearbeitet, bis er keine fermentativen Eigenschaften mehr aufwies. Alle Portionen der gesammelten Flüssigkeit verdünnte man mit destilliertem Eiswasser bis zu dem gleichen Volumen, welches das zur Fermentisolierung dienende Blut gehabt hatte. Die durchsichtige, farblose, das Ferment enthaltende Flüssigkeit stellte man auf 12 Stunden in die Kältemischung. Nach Ablauf dieser Zeit filtrierte man die Flüssigkeit und untersuchte ihre fermentativen Eigenschaften. Dieses Ferment bezeichnen wir als das Grundferment.

Die chemische Zusammensetzung des vorliegenden wässerigen Ferments war folgende:

Feste Substanzen 0,002 bis 0,0022 g in 100 ccm Flüssigkeit;

Wasserstoffionenkonzentration bei der Temperatur 13,5°—p_H = 7,67, nach *Michaelis* bestimmt;

Elektrische Leitfähigkeit bei der Temperatur 13,5°—$K = 1{,}52 \cdot 10^{-1}$ (nach Hinzufügen der Elektrolyte), nach *Kohlrausch* und *Holborn*.

Die Stickstoffbestimmung (Mikrokjeldahl) ergab 15,95 bis 16,12 Proz. N, im Durchschnitt 16,03 Proz. N.

Spezifisches Gewicht (pyknom.) 10000.

Viskosität und Oberflächenspannung vgl. Tabelle I.

Tabelle I.

Viskosität und Oberflächenspannung des Ferments [Stalagmometer von *Traube*[1])].

Nr.	Bezeichnung des Ferments	Anzahl der Tropfen	$\frac{100 \cdot s}{s \cdot w}$	$7158{,}4 \cdot s \cdot \frac{s\,w}{s}$	Dauer des Versuchs
1	Wasser	54½	—	—	16h
2	Ferment aus dem Blute des Menschen	58	101,4	6727,8	16
3	Ferment aus dem Blute des Pferdes	56½	104,6	6843,5	16
4	Ferment aus der Keimscheibe d. Hühnereies	60	111,1	6442	17 5′
5	Wasser	54	—	—	17 5

Isolierung des Ferments aus der Keimscheibe des Hühnereies.

Da wir die Absicht hatten, die Zelle näher zu untersuchen, wählten wir als zugänglichstes Objekt die Keimscheibe des Hühnereies aus. Die Zelle erscheint überhaupt als Herd der subtilsten chemischen Vorgänge. Es ist bekannt, daß sich nicht jedes zugeführte Produkt dem Bau der Zelle einfügt. Manchmal muß eine weitere Spaltung herbeigeführt werden, in anderen Fällen müssen sich einzelne Abbau-

[1]) *J. Traube*, Grundriß der physikalischen Chemie, Encke 1914 (Gebrauchsanweisung des Stalagmometers).

produkte miteinander vereinigen, um die für die Zelle passenden Bausteine bilden zu können. Dann erst beginnt die Synthese der verschiedenartigsten Baustoffe. Dieser komplizierte Aufbau wird durch das Ferment (die Fermente) und die Elektrolyte bewerkstelligt. Durch grobe Einwirkung starker Agenzien wird das Zellferment in seiner Wirkung stark geschwächt. Daher wandten wir zur Isolierung des Zellferments eine Methode unter Vermeidung starker Agenzien an. Sie besteht in folgendem:

Der Eidotter wird aus einem frischen Hühnerei derart befreit, daß die Keimscheibe nach oben gekehrt ist. Die Dottermembran und die Scheibe wird mit einer feinen Schere durchschnitten und die Keimscheibe vorsichtig in eine Pipette gesogen. Dabei muß man versuchen, den Dotter nicht mit aufzusaugen, da letzterer die Reinigung des Ferments erschwert. Die so entnommenen Keimscheiben aus vier Dottern brachte man in einen Zylinder mit 100 ccm destilliertem Wasser. Der Zylinder wird in eine Kältemischung von — 4 bis — 6° C gestellt und durch die Flüssigkeit Kohlensäure in langsamem Strome im Laufe von 20 Minuten geleitet, dann brachte man den Zylinder auf 24 Stunden in die Kältemischung. Nach Ablauf dieser Frist wird die Flüssigkeit in Zentrifugiergläschen gegossen und 15 Minuten lang zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird aus den Gläschen vorsichtig abgegossen. Der am Boden zurückgebliebene geringfügige Niederschlag wird mit kohlensäuregesättigtem Eiswasser versetzt und mit Quarz zerrieben, um das Ferment abzuscheiden. Sodann wird die Flüssigkeit zentrifugiert und die Zentrifugate in einem Gefäß gesammelt. Den Niederschlag bearbeitet man so lange, bis eine entnommene Probe keine fermentativen Eigenschaften mehr zeigt. Alle Flüssigkeiten werden in einem Gefäß gesammelt und destilliertes Eiswasser bis 200 ccm hinzugefügt. Alsdann erfolgt Zusatz von Chlornatrium und Natriumbicarbonat, so daß die elektrische Leitfähigkeit der Flüssigkeit $K = 1{,}13 \cdot 10^{-2}$ und $p_H = 7{,}95$ ist. Die fermenthaltige Flüssigkeit bringt man auf 12 Stunden in die Kältemischung und filtriert sie darauf. Dieses Ferment betrachten wir als das Grundferment.

Das Ferment hat vor der Zufügung des Chlornatriums und des Natriumbicarbonats folgende chemische Zusammensetzung:

Feste Substanzen bis 0,0023 g in 100 ccm der wässerigen Fermentlösung;

Spezifisches Gewicht (pyknometrisch) 10000;

Stickstoff nach Mikrokjeldahl bis 15,98 Proz.;

Viskosität und Oberflächenspannung (vgl. Tabelle I).

Um die verschiedenen fermentativen Eigenschaften — die diastatische, proteolytische und lipolytische — festzustellen, fügt man in jedem Falle die unten genannten Elektrolyte hinzu.

Bekanntlich übt das reine Ferment ohne Elektrolyte keine Wirkung aus. Wenden wir uns der Zerlegung der Kohlehydrate zu, so sehen wir, daß das Ferment seine Wirkung bei minimalen Elektrolytmengen entfaltet, oder es genügt auch das Medium, in welchem sich das Substrat befindet. Diese diastatische Fermenttätigkeit erklärt sich wohl dadurch, daß jeder lebendige Organismus besonders die Kohlehydrate ausnutzt, daher tritt die größte Aktivität bei den geringsten Elektrolytdosen auf.

In anderen Fällen stellten wir unser Ferment durch Zusatz von NaCl und $NaHCO_3$ auf ein p_H (bei Wasserstoffdurchleitung) von 8,30 ein; $K = 1{,}08 \cdot 10^{-2}$

Tabelle II.

Ferment aus dem Pferdeblut.

$p_H = 8{,}30$[1]), $K = 1{,}08 \cdot 10^{-2}$.

Menge der 0,5 proz. Stärke im Versuch . . . . 1 ccm
„ des Ferments für den Versuch . . . . . 1 „
Versuchstemperatur . . . . . 38°

Als Diastase.

Nr. der Versuche	Zuckermenge mg	Proz. der in Zucker übergeführten Stärke	Dauer des Versuchs
1	0,45	8,10	—
2	0,36	6,48	—
3	0,482	8,66	1h
4	0,456	8,20	—
5	0,462	8,30	—
6	1,053	18,85	12h
7	1,224	22,03	24
8	1,485	26,73	36

Kontrolle.

$p_H = 8{,}54$; $K = 1{,}17 \cdot 10^{-2}$.

Menge der 0,5 proz. Stärke . . . . . 1 ccm
Wasser mit den Elektrolyten bei oben angegebenem p_H und K = 1 ccm

1	0,0	0,0	12h
2	0,081	1,46	36

Tabelle III.

Ferment aus dem Blute des Menschen.

$p_H = 8{,}30$; $K = 1{,}08 \cdot 10^{-2}$.

Menge der 0,5 proz. Stärke im Versuch . . . . 1 ccm
„ des Ferments im Versuch . . . . . 1 „
Versuchstemperatur . . . . . 38°

Als Diastase.

Nr. der Versuche	Zuckermenge mg	Proz. der in Zucker übergeführten Stärke	Dauer des Versuchs
1	0,425	7,64	—
2	0,420	7,58	—
3	0,456	8,20	1h
4	0,472	8,48	—
5	0,380	6,84	—
6	0,395	7,10	—
7	1,125	20,24	12h
8	1,52	27,36	36

[1]) p_H wurde stets in der Elektrode mit durchgeleitetem Wasserstoff bestimmt, somit hatte die untersuchte Flüssigkeit in allen Fällen ein kleineres als das angegebene p_H.

Kontrolle.

$p_H = 8{,}54$; $K = 1{,}08 \cdot 10^{-2}$.

Menge der 5 proz. Stärke . . . . . 1 ccm

Wasser mit den Elektrolyten bei oben angegebenem p_H und $K = 1$ ccm

Nr. der Versuche	Zuckermenge mg	Proz. der in Zucker übergeführten Stärke	Dauer des Versuchs
1	0,0	0,0	12h
2	0,11	1,98	36

Tabelle IV.

Ferment aus der Keimscheibe des Hühnereies.

$p_H = 7{,}95$; $K = 1{,}13 \cdot 10^{-2}$.

Menge der 0,5 proz. Stärke für den Versuch . . 1 ccm

„ des Ferments im Versuch . . . . . 1 „

Versuchstemperatur . . . . . 38°

Als Diastase.

Nr. der Versuche	Zuckermenge mg	Proz. der in Zucker übergeführten Stärke	Dauer des Versuchs
1	0,30	5,40	—
2	0,45	8,10	1h
3	0,38	6,84	—
4	0,39	7,02	—
5	1,02	18,36	12h
6	1,22	21,96	24
7	1,20	21,60	24
8	1,50	27,00	36

Kontrolle.

$p_H = 7{,}68$; $K = 2{,}03 \cdot 10^{-2}$.

Menge der 5 proz. Stärke . . . . . 1 ccm

Wasser mit den Elektrolyten bei oben angegebenem p_H und $K = 1$ ccm

1	0,0	0,0	1h
2	0,09	1,62	36

Uns ist wohl bekannt, daß für das Ferment zur Entfaltung seiner proteolytischen Tätigkeit ein bestimmtes Medium mit bestimmter Wasserstoffionenkonzentration notwendig ist. Für die proteolytische Wirkung kann alkalische oder saure Reaktion vorliegen, sonst bleibt die fermentative Wirkung aus. Wenden wir uns nunmehr der lipolytischen Wirkung zu, so sehen wir das gleiche, d. h. hier muß ein schwach alkalisches Elektrolytmedium vorhanden sein, nur dann entfaltet das Ferment seine Tätigkeit.

Gewinnung der Elektrolyte.

In jedem einzelnen Falle muß, um eine Fermentwirkung hervorzurufen, ein bestimmter Gehalt an Elektrolyten und eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration vorliegen, erst dann übt das Ferment seine katalytische Wirkung aus. Die Elektrolyte allein (Cofermente) ohne Ferment führen nur eine vorbereitende Arbeit aus. Nehmen wir beispielshalber die Eiweißverdauung, so wissen wir, daß die Elektrolyte — die Salzsäure — die Eiweißstoffe zum Aufquellen bringen; dabei wird das Eiweiß (Fibrin) zwar durchsichtig, aber es löst sich nicht auf, wie lange Zeit man es auch bei der Temperatur von 38° stehen läßt. Sobald man aber nun das Ferment hinzufügt, so löst sich das durchsichtige Fibrin auf und das Eiweiß geht in Pepton über.

Da es schwierig ist, die kombinierte Zusammensetzung der Elektrolyte des Magensaftes und des pankreatischen Saftes sowie des Blutes auszuwählen, nahmen wir für diesen Zweck natürliche, nach der Methode von *I. P. Pawlow* erhaltene Verdauungssäfte.

Der Saft wurde in besonders langen Probiergläschen bis zur Trockne eingedampft. Das Probiergläschen wurde zugeschmolzen und der Inhalt über schwacher Flamme verkohlt. Nach dem Öffnen des Probiergläschens wurde der Inhalt in dem gleichen Volumen Wasser aufgelöst, wie das Volumen des angewandten Saftes war. Wurde Magensaft gebraucht, so wurde vor der Bearbeitung die Menge der Salzsäure, die Verdauungskraft, die Wasserstoffionenkonzentration und die elektrische Leitfähigkeit bestimmt. Ein derartiger Saft mit bekannter Acidität und peptischer Kraft wurde zur Gewinnung der Elektrolyte in oben beschriebener Weise behandelt. Der verdünnte Rest wurde nach dem Verkohlen auf ein p_H von 0,83 und $K = 5{,}2 \cdot 10^{-2}$ eingestellt, d. h. auf p_H und K des natürlichen Saftes vor dem Verkohlen.

In den Tabellen V und VI sind die Ergebnisse der proteolytischen Wirkung des von uns isolierten Ferments aus dem Blute des Menschen, des Pferdes und der Keimscheibe des Hühnereies in Gegenwart der aus dem Magensaft isolierten Elektrolyte angeführt.

Tabelle V.

Ferment aus dem Blute des Menschen.

Ferment	$p_H = 8{,}30$; $K = 1{,}08 \cdot 10^{-8}$
Elektrolyte, gelöst	$p_H = 0{,}83$; $K = 5{,}2 \cdot 10^{-2}$
Menge des für den Versuch verwandten Ferments	2 ccm
Menge der Elektrolytlösung	5 „
Temperatur	38°
Dauer der Verdauung	24 Stunden

Der Stickstoff wurde nach *Sörensen* bestimmt.

Als Protease.

Nr. der Versuche	Menge des Fibrins g	Menge des Amino-N mg	Amino-N in Proz.	Amino-N in Proz. des Gesamt-N
1	1,9689	4,76	0,24	21,05
2	1,2520	2,08	0,166	14,56
3	2,5040	4,08	0,160	14,03
		Kontrolle		
4	1,8420	0,41	0,022	1,80

Nr. der Versuche	Menge des Fibrins g	Menge des Amino-N mg	Amino-N in Proz.	Amino-N in Proz. des Gesamt-N
	Ferment aus dem Blute des Pferdes			
1	2,0100	4,20	0,20	17,54
2	1,5850	2,35	0,148	13,00
3	2,8010	4,80	0,171	5,00
		Kontrolle		
4	1,0020	0,44	0,03	2,62

Tabelle VI.

Ferment aus der Keimscheibe des Hühnereies.

Ferment . . . . . $r_H = 7{,}97$; $K = 1{,}08 \cdot 10^{-2}$
Elektrolyte, gelöst . . . . $r_H = 0{,}89$; $K = 5{,}2 \cdot 10^{-2}$
Menge des Ferments für den Versuch . . . . . 2 ccm
Menge der Elektrolytlösung . . . . . 38,5 „
Dauer der Verdauung . . . . . 24 Stunden

Als Protease.

Nr. der Versuche	Fibrinmenge g	Menge des Amido-N mg	Amido-N nach *Sörensen* Proz.	Verhältnis des Amido-N zum Gesamt-N Proz.
1	2,0150	2,10	0,103	9,03
2	1,5420	2,32	0,15	13,15
3	2,4050	4,08	0,168	14,71
		Kontrolle		
4	1,9600	0,46	0,023	1,92

Für die lipolytische Fermentwirkung gewann man die Elektrolyte aus dem pankreatischen Safte.

Bei der lipolytischen Verdauung der Fette hielt man alle Bedingungen für die Verdauung wie beim natürlichen pankreatischen

Safte ein, d. h. man stellte $p_H = 8{,}54$ und die elektrische Leitfähigkeit $K = 1{,}41 \cdot 10^{-2}$ ein.

Für das aus der Keimscheibe des Hühnereies ausgeschiedene Ferment stellte man das Elektrolytmedium auf $p_H = 7{,}95$ und $K = 1{,}13 \cdot 10^{-2}$ ein. Vgl. die Tabellen VII, VIII, IX.

Tabelle VII.

Ferment aus dem Blute des Pferdes.

$p_H = 8.54$; $K = 1{,}141 \cdot 10^{-2}$.

Menge der 2proz. Emulsion aus neutralem Fett . 5 ccm[1])
Fermentmenge . . . . . 2 „
Temperatur . . . . . 38,5°
Versuchsdauer . . . . . 12 Stunden

Als Lipase.

Nr. der Versuche	Menge der verbrauchten n/100 KOH-Lösung ccm	Menge der freien Fettsäuren mg
	1. Versuch.	
1	11,1	31,3
2	10,3	29,0
3	12,5	35,2
	Kontrolle	
4	1,1	3,1
	2. Versuch.	
Anstatt der Emulsion ist neutrales Fett zu 1 ccm genommen.		
1	9,5	26,8
2	10,2	28,8
3	9,8	27,6
	Kontrolle	
4	1,1	3,1

Tabelle VIII.

Ferment aus dem Blute des Menschen.

$p_H = 8{,}54$; $K = 1{,}41 \cdot 10^{-2}$.

Menge der 2proz. Emulsion aus neutralem Fett 5 ccm
Fermentmenge . . . . . 2 „
Temperatur . . . . . 38,5°
Versuchsdauer . . . . . 12 Stunden

[1]) Die Menge der freien Fettsäuren wurde auf Oleinsäure berechnet.

Als Lipase.

Nr. der Versuche	Menge der verbrauchten n/100 KOH-Lösung ccm	Menge der freien Fettsäuren mg
	1. Versuch.	
1	14,8	41,7
2	13,2	37,2
3	12,6	35,5
	Kontrolle	
4	1,4	3,9

2. Versuch mit neutralem Fett.

Statt der Emulsion ist in jedem Versuch 1 ccm Neutralfett genommen.

1	10,5	29,6
2	9,8	27,6
3	11,1	31,3
	Kontrolle	
4	1,1	3,1

Tabelle IX.

Ferment aus der Keimscheibe des Hühnereies.

$p_H = 7{,}95$; $K = 1{,}13 \cdot 10^{-8}$.

Menge der 2proz. Emulsion aus neutralem Fett 2 ccm
Fermentmenge . . . . . 2 „
Temperatur . . . . . 38,5°
Versuchsdauer . . . . . 12 Stunden

Als Lipase.

Nr. der Versuche	Menge der verbrauchten n/100 KOH-Lösung ccm	Menge der zersetzten Fettsäuren mg
	1. Versuch.	
1	9,2	25,9
2	8,7	24,5
3	10,3	29,0
	Kontrolle	
4	1,00	2,8

2. Versuch mit neutralem Fett.

Statt der Emulsion ist zu jedem Versuch 1 ccm Neutralfett genommen

1	8,5	24,5
2	8,2	23,1
3	9,3	26,2
	Kontrolle	
4	1,1	3,1

Was die Katalase anbelangt, so sind wir beim Studium unseres Ferments zu dem Schluß gekommen, daß die Katalasewirkung nicht durch ein spezifisches Ferment, sondern durch die Elektrolyte (Cofermente) bedingt ist, hauptsächlich und vielleicht sogar einzig und allein durch das Eisen.

S. Hennichs ist in seiner Arbeit über Katalase auch geneigt, anzunehmen, daß in dem vorliegenden Prozeß das Eisen die Hauptrolle spielt.

Wir werden die Rolle der Elektrolyte in der vorliegenden Mitteilung nicht eingehend behandeln, da wir hoffen, darüber in einem speziellen Aufsatz demnächst berichten zu können.

Wir gehen nunmehr zur Besprechung der von uns angeführten Tabellen über. Wir untersuchten die Wirkung unseres Ferments auf Kohlehydrate, Eiweißstoffe und Fette. Als Substrat für unsere Versuche dienten folgende Substanzen: Für die Kohlehydratverdauung eine 0,5proz. Stärkelösung, für die Eiweißverdauung das geronnene, faserige Fibrin des Pferdeplasmas und für die lipolytische Wirkung neutrales Oleum olivarum und eine Emulsion aus neutralem Fett.

Betrachten wir zunächst die Kohlehydratspaltung. Wie man aus den Tabellen II, III und IV ersieht, verläuft die Verdauung nicht proportional der Zeit; in dem Maße, als sich die Hydrolyseprodukte anhäufen, verlangsamt sich der Prozeß der Stärkesaccharifizierung immer mehr. Nach einstündiger Verdauung haben wir in allen fünf Proben fast gleiche Mengen Zucker. Bei weiterem Stehen im Brutschrank bis 12, 24 und 36 Stunden ging die Saccharifizierung immer schwächer vonstatten, und man beobachtete dabei keine Proportionalität. Werden aber die Produkte der Stärkezersetzung während des Verdauungsprozesses wegdialysiert, so kann man auf diese Weise eine fast vollkommene Hydrolyse der Stärke während 6 Stunden erreichen.

Zu diesem Behuf nahmen wir eine Kollodiumhülse, gossen in dieselbe 1 ccm 0,5proz. Stärkelösung und 1 ccm des Ferments und tauchten diese Hülse in ein Gläschen, in welchem sich 3 ccm 0,9proz. Chlornatriumlösung befanden. Alles wurde auf 50 Minuten in den Thermostaten bei 38° C gestellt. Nach Ablauf dieser Frist nahm man die Hülse mit ihrem Inhalt heraus und stellte sie in ein anderes Reagenzgläschen mit 3 ccm 0,9proz. Chlornatriumlösung, darauf verfuhr man auf diese Weise weiter. Nach sechsstündiger Verdauung erhielten wir bei einer derartigen Abtrennung der Verdauungsprodukte 71,2 Proz. der in Zucker übergeführten Stärke. Der Zucker wurde nach der Methode von *M. Galwialo* bestimmt. Vgl. Tabelle X.

Auf Grund der oben angeführten experimentellen Ergebnisse sehen wir, daß das von uns aus dem Blute des Menschen, des Pferdes

und aus der Keimscheibe des Hühnereies abgeschiedene Ferment, wenn es unter bestimmten Bedingungen arbeitet, verschiedene Wirkungen entfaltet. Am einschneidendsten aber, was Aufmerksamkeit verdient, ist der Umstand, daß in den Zellen (Keimscheibe des Hühnereies) ein diastatisches, proteolytisches und lipolytisches Ferment vorhanden ist. Vergleicht man die Intensität des Ferments, das aus 200 ccm Blut isoliert worden ist, mit der Intensität des aus vier Keimscheiben

Tabelle X.

Ferment aus dem Blute des Pferdes.

$p_H = 8{,}30$; $K = 1{,}08 \cdot 10^{-8}$.

Menge der 0,5proz. Stärke für den Versuch . . 1 ccm
Menge des Ferments für den Versuch . . . . . 1 „
Temperatur . . . . . 38°

Als Diastase.

Nr. der Dialysationsversuche	Zuckermenge mg	Proz. der in Zucker übergeführten Stärke	Dauer der Dialyse und der Verdauung im Thermostaten Min.
1	0,90	16,20	50
2	0,86	15,40	50
3	0,64	11,52	90
4	0,54	9,72	50
5	0,48	8,64	50
6	0,36	6,48	50
7	0,18	3,24	50

des Hühnereies abgeschiedenen Enzyms, so erweist sich die fermentative Kraft der Zellen des Hühnereies im Vergleich mit der fermentativen Kraft des Blutes als eine sehr große.

Unwillkürlich erinnert man sich der Versuche über die Verdauung an niederen Wirbellosen von *N. Krawkow* und *Lewes*, *Couch* und *Krukenberg*, welche experimentell folgendes dargetan haben: Alle Versuche, Fermente (Enzyme) in den Flüssigkeiten der Körperhöhlen von Schwämmen, Aktinien und Medusen, sowie in den Flüssigkeiten, die ihren Körper bedecken, aufzufinden, ergaben ein negatives Resultat, d. h. es wurde gezeigt, daß diese Flüssigkeiten gar keine fermentative Eigenschaften aufweisen. Fibrinstückchen, welche in speziellen Glasröhrchen oder in Papierhülsen in die Körperhöhle der Aktinien und Medusen eingeführt waren, blieben im Laufe einiger Tage gänzlich unverändert, dagegen wurden Fibrinfasern, die durch den Körper dieser Tiere gezogen waren, verdaut.

Wie man aus den angeführten Angaben ersieht, spielen sich die subtilsten chemischen Prozesse nicht außerhalb, sondern im Innern der Zelle selbst ab. In den Höhlenflüssigkeiten findet gar keine Ver-

dauung statt. *N. Krawkow* hat noch die Tatsache vermerkt, daß das Seewasser die Fermentwirkung sehr verstärkt.

W. Biedermann hat in seinen Arbeiten über das diastatische Ferment beobachtet, daß bei Herabsetzung des Salzgehaltes (Cofermente) die fermentative Wirkung vermindert wird. Die Amylase, die frei von den Salzen der Lösung ist, ist gänzlich inaktiv.

Dringt man näher in das Studium der Fermentwirkungen ein, so drängt sich einem beim Vorfinden dieser riesigen Anzahl von Fermentbezeichnungen, die ihren Namen von dem Substrat, auf das sie einwirken, erhalten haben, natürlich die Frage auf, ob tatsächlich die Annahme einer so großen Menge von Fermenten mit einer so strengen Spezifität, wie sie ihnen jetzt zugeschrieben wird, notwendig ist. Von Tag zu Tag entstehen immer wieder neue Fermentnamen.

S. Kostytschew bemerkt dazu, daß jährlich Mitteilungen über die Entdeckung neuer Fermente in pflanzlichen und tierischen Geweben gemacht werden, welche neue spezifische biochemische Reaktionen geben. Es unterliegt natürlich keinem Zweifel, daß alle wichtigen Veränderungen des Stoffes in lebenden Zellen vermittelst der Fermente geschehen, aber unwillkürlich werden doch Bedenken laut, ob nicht die Zahl der beschriebenen Fermente zu groß ist und der wirklichen Sachlage entspricht.

Bei der Entdeckung neuer Fermente sind oft nicht nur die physikalisch-chemischen Kontrollen ungenügend durchgeführt, mitunter wird auch die in Frage stehende biochemische Reaktion unrichtig festgestellt.

Es ergeben sich aus unserer Arbeit folgende Schlußfolgerungen:

1. Das nach unserer Methode aus dem Blute und aus der Keimscheibe des Hühnereies abgeschiedene Ferment stellt eine stickstoffhaltige organische Substanz vor.

2. Die Intensität der fermentativen Wirkung ist von dem Gehalt und dem Charakter der Elektrolyte abhängig.

3. Das Ferment saccharifiziert die Stärke beim Minimum des Elektrolytgehaltes.

4. Die proteolytische Wirkung des Ferments ist bei Einführung natürlicher (aus dem Magensaft erhaltener) Elektrolyte scharf ausgeprägt, so daß $p_H = 0{,}89$ und die elektrische Leitfähigkeit $K = 5{,}2 \cdot 10^{-2}$ ist.

5. Die lipolytische Fermentwirkung verläuft schon bei geringfügigem Zusatz von Soda, aber noch besser bei Hinzufügung der aus dem pankreatischen Safte erhaltenen Elektrolyte, d. h. bei $p_H = 8{,}54$ und $K = 1{,}4 \cdot 10^{-2}$.

Literatur.

1) *R. Heidenhain*, Pflügers Arch. **10**, 557, 1875. — 2. *T. Osborne*, Journ. Amer. Chem. Soc. **18**, 536, 1896. — 3) *E. Buchner*, Zymasegärung **35**, 1903. — 4) *O. Loew*, Pflügers Arch. **95**, 1904. — 5) *E. Hirschfeld*, ebendaselbst **39**, 499, 1886. — 6) *G. Bertrand*, Bull. Soc. Chem. **3**, 11, 1894. — 7) *M. Galwialo*, Wratschebnaja Gaseta, Nr. 5, 1924. — 8. *v. Euler*, Chem. d. Enzyme 1920/23; Ber. **55**, 3583, 1922. — 9) *Derselbe*, diese Zeitschr. **85**, 405, 1915. — 10) *v. Euler* und *Myrbäck*, H. S. **120**, 61, 1922; **136**, 107, 1924. — 11) *Fodor*, Das Fermentproblem 1922. — 12) *Willstätter*, Ber. **55**, 1922. — 13) *Willstätter* und *Kuhn*, H. S. **115**, 1921. — 14) *E. Abderhalden*, Abwehrfermente 1914. — 15) *S. Henichs*, diese Zeitschr. **171**, 314, 1926. — 16) *S. Kostytschew*, H. S. **154**, 1926. — 17) *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl. — 18) *Kohlrausch* und *Holborn*, Das Leitvermögen der Elektrolyte 1898. — 19) *Sörensen*, diese Zeitschr. **7**, 45, 19.8; H. S. **64**, 1910. — 20) *M. Galwialo*, Wratschebnaja Gaseta 1923, Nr. 24, S. 514.

Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie.

I. Mitteilung:

Einige physikalisch-chemische Veränderungen des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier[1]).

Von

G. E. Wladimiroff.

(Aus dem Laboratorium für physiologische Chemie an der militär-medizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 7. August 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I.

Während der kurzen Periode der embryonalen Entwicklung verwandelt sich die befruchtete Eizelle in einen kompliziert aufgebauten Organismus.

Der Morphologie der dabei sich abspielenden Veränderungen ist eine außerordentlich große Anzahl von Arbeiten gewidmet, dagegen sind die Untersuchungen über die chemischen Entwicklungsverhältnisse relativ wenig zahlreich. Die Ursache liegt wohl darin, daß in der Physiologie die morphologischen Studien stets den chemischen vorausgegangen sind, und überdies ist das Studium der äußerst kleinen und halbflüssigen Objekte besonders schwierig, und gerade eine solche Form weisen die einzelnen Embryonalgewebe auf.

Indessen verspricht das Studium dieses Abschnittes der Physiologie, in Zukunft den Schlüssel zum Verständnis einer ganzen Reihe physiologischer Erscheinungen und Zustände zu liefern oder wenigstens sie von einem neuen Standpunkt aus zu betrachten. Viele Funktionen stellen sich nämlich im embryonalen Zustand in ihrer ursprünglichen Einfachheit vor. Als Beispiel können wir auf die Resorptionsprozesse durch wenig differenzierte, verhältnismäßig einfach gebaute Membranen, sowie auf Ausscheidungsprozesse durch ähnliche Membranen oder

---

[1]) Mitgeteilt am 27. Mai 1926 auf dem zweiten allrussischen Physiologenkongreß.

embryonale Organe hinweisen. Weiter kann das chemische Studium der Differenzierung und des Wachstums der Gewebe (des Blutes, der Muskeln, Knorpel, Hornbildungen usw.), indem dadurch die chemische Genese der letzteren aufgedeckt wird, unsere Vorstellungen über die Wechselbeziehungen zwischen verschiedenen Geweben, welche bis jetzt nur in morphologischer Hinsicht festgestellt sind, vertiefen. Der embryonale Zustand eignet sich am besten für das Studium der synthetischen Vorgänge im Organismus, welche zu dieser Zeit die höchste Entfaltung und Intensität aufweisen. Besondere Aufmerksamkeit verdienen die Funktionen der Organe, welche nur dem embryonalen Zustand eigen sind (z. B. die Funktion des Amnions, der Allantois, einige Funktionen der Leber). Ein großes Interesse bieten endlich die Besonderheiten des Stoffwechsels.

Im Jahre 1924 begann ich auf Veranlassung von Prof. *M. D. Iljin* die systematische Bearbeitung dieses Gebiets.

Als Objekt für das Studium wurde das Hühnerei gewählt. Die Erwägungen, welche diese Wahl bestimmten, waren folgende: 1. Die Entwicklung des Hühnereies in morphologischer Hinsicht ist genau studiert, die meisten Arbeiten chemischen Charakters sind auch an ihm ausgeführt. 2. Bei der Entwicklung kommen in das Hühnerei keine Fremdkörper hinein, mit Ausnahme des Sauerstoffs, und es verliert auch keine Bestandteile, Wasser und Kohlensäure ausgenommen. 3. Das Hühnerei stellt auch insofern ein äußerst bequemes Objekt dar, als man es einerseits in beliebiger Menge sehr leicht erhalten kann, und andererseits ist die Inkubation einfach und von kurzer Dauer. Die Eier wurden von großen Hühnerhöfen bezogen. Die Inkubation erfolgte im Inkubator „Orlowka" nach dem System von *Bastide*. Die regelrechte Inkubation bestätigte sich am 21. bis 22. Tage durch Züchtung normaler Küchlein, von denen ein Teil noch zurzeit lebt.

Den Gegenstand der ersten Mitteilung bilden einige physikalisch-chemische Veränderungen des Eiereiweißes bei der Entwicklung des Hühnereies.

II.

Das Eiereiweiß dient als Nährmaterial und in den ersten Inkubationstagen als äußeres Medium, das den Embryo umgibt. Bei der Entwicklung desselben werden verschiedene Bestandteile des Eiereiweißes mit ungleicher Geschwindigkeit verbraucht. Das Eiereiweiß ändert sowohl seine Zusammensetzung als auch seine äußeren Eigenschaften. Vor allem wird es dicker, zäher und klebriger, was mit der Zunahme des Prozentgehalts fester Substanzen zusammenhängt. Nach den Angaben von *M. D. Iljin* (20) enthält das Eiereiweiß frischer Hühnereier 11,7 bis 14,6 Proz. fester Substanzen. *Bellini* (5) gibt für das Eiereiweiß am 12. bis 14. Tage 43 bis 45 Proz. fester Substanzen an. Da der Gehalt an festen Substanzen eine große Rolle für viele Schlußfolgerungen spielt, prüften wir die angeführten Angaben für unsere Eier nach. Man muß bemerken, daß das Eiereiweiß des frischen Hühnereies auch in den ersten Inkubationstagen in zwei Portionen getrennt werden kann, eine flüssigere und eine dichtere. Der Gehalt an festen Substanzen entspricht nicht immer der Konsistenz; der Unterschied ist gering-

fügig, und nicht immer finden sich in dem flüssigeren Eiereiweiß weniger feste Substanzen als in dem dichten. In unseren Bestimmungen wurden die festen Substanzen des dichteren Eiereiweißes bestimmt.

Tabelle I.

Nr. der Eier	Inkubationstage	Proz. fester Substanzen (Mittel aus zwei Gewichtsproben)	Im Durchschnitt	Nr. der Eier	Inkubationstage	Proz. fester Substanzen (Mittel aus zwei Gewichtsproben)	Im Durchschnitt
1	2	13,0		18	10	36,9	
2	2	12,6	13,1	19	10	36,8	36,8
3	2	13,8		20	11	38,8	
4	3	13,7		21	11	36,1	37,7
5	3	15,0	14,3	22	11	38,2	
6	4	16,0		23	12	36,9	36,9
7	4	16,4	16,0	24	13	39,0	38,3
8	4	15,6		25	13	37,6	
9	5	20,2	20,2	26	14	41,9	39,1
10	6	29,1	27,8	27	14	36,4	
11	6	26,6		28	15	40,2	40,2
12	7	28,8	28,8	29	16	37,5	
13	8	31,7	33,0	30	16	39,9	38,0
14	8	34,2		31	16	36,6	
15	9	35,4		*32*	*17*	*36,6*	*36,6*
16	9	35,8	35,5	33	20	41,5	41,5
17	9	35,2					

Wie man aus der Tabelle ersieht, wächst die Menge fester Substanzen im Eiereiweiß bis zu einer enormen Höhe an. Obgleich wir niemals die von *Bellini* (5) angegebenen maximalen Zahlen (45 Proz.) erhalten haben, ist doch der Reichtum des Eiereiweißes, als einer Gallerte tierischen Ursprungs, an festen Substanzen ungewöhnlich groß. In dieser Beziehung können mit ihm nur noch die Erythrocyten und die Augenlinse wetteifern.

Im Zusammenhang damit bietet das Eiereiweiß von zwei Gesichtspunkten aus ein großes Interesse. Erstens stellt es ein eigenartiges System dar, in welchem die enorme Eiweißmenge deutlich ihren Einfluß auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Gallerte ausüben muß. Diesem Umstand werden wir später noch mehrmals begegnen. Zweitens entsteht die Frage, in welcher Weise die Umgruppierung des Wassers im sich entwickelnden Hühnerei zustande kommt, und unter dem Einfluß welcher Kräfte die so energische Wasserentziehung aus der zum Aufquellen fähigen Gallerte vor sich geht.

Als erstes, dem Eiereiweiß Wasser entziehendes Reservoir tritt der Dotter auf (vgl. Tabelle II).

Tabelle II.

Gehalt fester Substanzen im Dotter sich entwickelnder Hühnereier.

Nr. der Eier	Inkubationstage	Proz. fester Substanzen (Mittel aus zwei Gewichtsproben)	Im Durchschnitt	Nr. der Eier	Inkubationstage	Proz. fester Substanzen (Mittel aus zwei Gewichtsproben)	Im Durchschnitt
1	2	50,1	50,1	14	9	46,0	46,3
2	3	50,3	50,3	15	9	46,6	
3	4	50,3	45,3	*16*	*10*	*42,2*	*42,2*
4	4	40,4		17	12	50,1	50,1
5	5	41,8	41,4	18	13	51,0	51,1
6	5	41,0		19	13	51,3	
7	6	40,1	42,4	20	14	51,7	51,7
8	6	41,1		*21*	*15*	*50,5*	*50,5*
9	6	43,4		*22*	*17*	*50,6*	*50,6*
10	6	45,1		23	20	55,7	55,7
11	7	35,0	35,0	24	21	54,2	54,2
12	8	43,7	44,3				
13	8	44,9					

Vom fünften Inkubationstage an verflüssigt sich der Dotter stark und bleibt in diesem Zustande bis zum zehnten Tage. Zu dieser Zeit ist es sehr schwer, den Dotter unversehrt aus dem Ei herauszunehmen. Besonders unmittelbar unter dem Embryo ist der Dotter verflüssigt. Wir ließen zwei Eier, welche im Inkubator 7 Tage gelegen hatten, in einer Kältemischung gefrieren. Unter dem Embryo hatte sich helles Eis gebildet, aus dem beim Schmelzen eine fast durchsichtige, etwas gelbliche Flüssigkeit entstand, außerdem erhielten wir über 5 ccm einer undurchsichtigen, orangefarbenen Flüssigkeit. Beim Überführen dieser Eier in kochendes Wasser gerinnt der untere Teil des Dotters, der obere (unter dem Embryo) bleibt flüssig. Die Grenze zwischen den beiden Abschnitten ist uneben, höckerig. Vom zehnten Tage an wird der Dotter an Wasser ärmer, und bei Beendigung der Inkubation ist der Gehalt fester Substanzen im Dotter ein höherer als im frischen Ei.

Das zweite Reservoir, das wasserentziehend wirkt, ist der Embryo. In den ersten Tagen der Entwicklung ist der Embryo sehr wasserreich. Nach den Angaben von *M. D. Iljin* enthält der Hühnerembryo am fünften Entwicklungstage im ganzen nur etwa 5 Proz. fester Substanzen; ihre Menge vergrößert sich allmählich und erreicht am 14. Tage 10 Proz. und am 18. bis 20. Tage etwa 20 Proz. Analoge Angaben führen auch *Hasselbalch* (16) und *Bialaszewicz* (6) an.

An dem Prozeß der Fortbewegung des Wassers im Ei nehmen auch die Nebenfruchthöhlen in beträchtlichem Maße teil. Letztere werden an Flüssigkeit immer reicher. Nur in den letzten Tagen der Inkubation wird die Flüssigkeit der Nebenfruchthöhlen vom Embryo zurückresorbiert.

Schließlich muß man auch den Wasserverlust infolge Verdunstung durch die Eischale berücksichtigen.

In welcher Weise vollzieht sich nun diese Wanderung des Wassers?

Die Anreicherung des Dotters mit Flüssigkeit behandelten einige Forscher als unmittelbaren Übergang des Wassers aus dem Eiereiweiß

in den Dotter [*Foster* und *Balfour* (11), *Bellini* (5)], aus dem Dotter gehe es alsdann in den Embryo über. Diese Vorstellung erscheint uns sehr wenig wahrscheinlich. In den sich nicht entwickelnden Eiern sieht man selbst bei lange dauerndem Verweilen im Inkubator fast gar keinen Übergang aus dem Eiereiweiß in den Dotter. Ferner beobachtet man, wie oben erwähnt wurde, die größte Verflüssigung des Dotters unmittelbar unterhalb des Embryos. Wenn das Wasser des Eiereiweißes durch die Dottermembran in den Dotter und aus dem Dotter in den Embryo resorbiert werden würde, so müßte man umgekehrte Verhältnisse erwarten. Beginnt nun der Dotter, wasserärmer zu werden, d. h. resorbiert der Embryo das Wasser aus dem Dotter, so wird die Konsistenz des Dotters gleichmäßig. Die Bahn des Wassers führt durch die Fruchtnebenhöhlen und natürlich auch durch den Embryo. Somit existiert anfangs eine starke Strömung des Wassers in den Embryo und außerdem durch diesen in den Dotter und die Fruchtnebenhöhlen. Der Dotter erreicht bald den maximalen Wassergehalt; vom zehnten Tage an beginnt wieder ein Rückstrom in den Embryo und in die Fruchtnebenhöhlen, die immer reicher an Flüssigkeit werden. In der letzten Inkubationswoche tritt eine Wendung auch für die letzteren ein, ihre Flüssigkeit wird vom Embryo rückresorbiert. Die absolute Menge des Wassers im Embryo wächst bis zum Durchbruch des Küchleins durch die Eischale an.

Gleichzeitig mit diesen Wanderungen des Wassers erfolgt die Wasserabgabe infolge Verdunstung durch die Eischale, wobei in der ersten Woche die Eiereiweißmasse das Wasser unmittelbar abgibt, und im weiteren der Embryo selbst durch die mit Blut reichlich versorgte seröse Membran.

Die Quelle der Kräfte, die den Übergang des Wassers aus dem einen Stoff in den anderen bedingt, läßt sich, worauf schon *Bialaszewicz* (6) hinweist, nicht nur in den Differenzen des osmotischen Druckes erkennen. Aber wenn man annimmt, daß der Embryo das zentrale Glied der Kette bildet, die das Wasser bei seinen Wanderungen passiert, so fällt der Parallelismus zwischen den Wendepunkten im Wassergehalt der Stoffe des sich entwickelnden Eies und der Differenz des osmotischen Druckes zwischen dem Embryo und den entsprechenden Stoffen auf. [Über den osmotischen Druck vgl. die Angaben von *Bialaszewicz* (6).] Gerade der Strom des Wassers in den Embryo ist mit dem höheren osmotischen Druck in demselben verknüpft. Nach *Bialaszewicz* besteht ein Widerspruch darin, daß bei Vorhandensein der in bezug auf den Embryo hypertonischen Amnialflüssigkeit (sechster bis zehnter Tag) eine Anreicherung des Embryos mit Wasser beobachtet wird, er läßt sich jedoch beseitigen, wenn man berücksichtigt, daß zu dieser Zeit der Embryo das Wasser durch die hypotonischen Stoffe — das Eiereiweiß

und darauf den Dotter — anreichert. In den letzten Tagen aber wird die Amnialflüssigkeit durch den Embryo resorbiert, wenn der osmotische Druck im Embryo den der Amnialflüssigkeit übersteigt. Diese Frage wird ihre endgültige Lösung dann finden, wenn die Veränderungen der Gesamtmenge des Eiereiweißes an amnialer und allantoider Flüssigkeit klargestellt sein werden.

Außer der Energie des osmotischen Druckes müssen wir noch mit den Kräften rechnen, welche mit der Fähigkeit der Eiweißsubstanzen zum Aufquellen verbunden sind. Nach den Angaben für andere Gallerten kann die Intensität der Aufquellung, wenn der Gehalt an festen Substanzen 40 Proz. beträgt, wie das beim Eiereiweiß in den letzten Tagen seines Vorhandenseins der Fall ist, einige Atmosphären erreichen [vgl. *Höber* (18), *Freundlich* (12)]. Um einer solchen Gallerte das Wasser zu entziehen, müssen diese Kräfte überwunden werden. Die Differenz des osmotischen Druckes ist dafür nicht ausreichend. In diesem Falle liegt ein komplizierterer Mechanismus vor, dem wohl die ungleiche Durchlässigkeit der embryonalen Membranen für verschiedene Substanzen in verschiedenen Richtungen zugrunde liegt. Dieses Problem werden wir später weiter verfolgen.

III.

Die Veränderungen der Gesamtmenge der Elektrolyte im Eiereiweiß des sich entwickelnden Eies sind noch nicht genügend studiert. Es liegt nur eine Arbeit von *Bellini* vor, aber erstens sind dort nur relative Angaben gemacht, da zwar der Widerstand des Eiereiweißes im Meßgefäß angegeben, die Kapazität des Widerstandsgefäßes aber nicht mitgeteilt ist, zweitens ist die Veränderung nur bis zum achten Tage verfolgt worden, während das Eiereiweiß erst am 16. bis 17. Tage verschwindet, und drittens ist die Deutung der erzielten Ergebnisse unbefriedigend.

Wir bedienten uns der üblichen Vorrichtung von *Kohlrausch* mit dem Telephon. Die Messung wurde im U-förmigen Gefäß mit großer Widerstandskapazität und weißem Platin als Elektrode ausgeführt. Die Widerstandskapazität wurde von Zeit zu Zeit durch die Leitfähigkeitsbestimmung einer genauen Gewichtsprobe geglühten Chlorkaliums geprüft [*Kohlrausch* und *Holborn* (22)]. Die Anfüllung des Widerstandsgefäßes bot in den letzten Tagen des Vorhandenseins des Eiereiweißes wegen dessen Dichte große Schwierigkeiten. Durch vorsichtiges Ansaugen am anderen Schenkel des U-förmigen Gefäßes gelang es jedoch in allen Fällen, den nötigen Raum ohne Bläschen völlig anzufüllen. Die Entfernung des Eiereiweißes bereitete noch größere Schwierigkeiten; wir gelangten zum Ziele durch Verdünnung des Eiweißes, indem wir es mit konzentrierter Lauge übergossen und während 24 Stunden an einem warmen Orte stehen ließen.

Die Bestimmungen wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt. Das Widerstandsgefäß tauchte in ein Wasserbad ein. Die Temperatur wurde

mittels zweier Thermometer — eins im Wasserbad und das andere in einem Schenkel des Gefäßes — kontrolliert. Die erhaltenen Angaben sind auf eine Temperatur von 18° reduziert, wofür in der ganzen Versuchsreihe die Temperaturkorrektur bestimmt ist. Im Durchschnitt beträgt sie 2,3 Proz. der Leitfähigkeit für je 1° C.

In den Tabellen sind die Zahlen in den Einheiten von *Kohlrausch* angeführt, d. h. man nimmt für die Einheit der Leitfähigkeit das Leitvermögen derjenigen Substanz, deren Säule von 1 cm Länge in 1 qcm Querschnitt den Widerstand 1 Ohm hat.

Die Leitfähigkeit des Eierklars der Eier, welche nicht der Inkubation ausgesetzt waren, betrug im Durchschnitt $7{,}6 \cdot 10^{-3}$ (s. Tabelle III).

Tabelle III.

Die elektrische Leitfähigkeit des Eiereiweißes der Hühnereier, welche nicht der Inkubation ausgesetzt waren.

Nr.	$10^3 \cdot \varkappa_{18}$	Nr.	$10^3 \cdot \varkappa_{18}$	Nr.	$10^3 \cdot \varkappa_{18}$
1	7,61	6	7,51	11	7,50
2	7,80	7	7,51	12	8,02
3	7,76	8	7,29	13	7,37
4	7,34	9	7,47	Im Durchsch. 7,60	
5	7,61	10	7,98		

Die Leitfähigkeit des Eiereiweißes derjenigen Eier, welche der Inkubation ausgesetzt waren und sich nicht entwickelt hatten, vergrößert sich allmählich infolge der Verdunstung des Wassers und der dadurch bewirkten Konzentrierung des Eiereiweißes. Bei lange dauerndem Verweilen im Inkubator kann die Steigerung beträchtlich sein. In dieser Hinsicht ist die Porosität der Eischale von großer Bedeutung.

Tabelle IV.

Elektrische Leitfähigkeit des Eiereiweißes der Hühnereier, welche der Inkubation ausgesetzt waren, aber sich nicht entwickelt hatten.

Nr.	Inkubationstage	$10^3 \cdot \varkappa_{18}$	Nr.	Inkubationstage	$10^3 \cdot \varkappa_{18}$
1	3	7,55	6	16	8,11
2	4	7,64	7	18	11,94
3	5	7,62	8	19	9,36
4	5	7,97	9	20	9,58
5	8	8,96			

Im Eiereiweiß sich entwickelnder Hühnereier beobachtet man eine schroffe Veränderung der Leitfähigkeit.

Tabelle V.

Elektrische Leitfähigkeit des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier.

Nr.	Inkubationstage	$10^3 . \varkappa_{18}$	Durchschnittlich	Nr.	Inkubationstage	$10^3 . \varkappa_{18}$	Durchschnittlich
1	2	7,91		17	7	5,07	5,07
2	2	8,39		18	8	5,28	
3	2	7,78	8,38	19	8	3,92	*4,71*
4	2	8,97		*20*	*8*	*4,93*	
5	2	8,84		21	10	3,90	3,57
6	3	7,28	7,28	22	10	3,24	
7	3	7,28		23	11	3,87	3,79
8	4	8,18		24	11	3,71	
9	4	7,45	7,61	25	12	3,39	3,39
10	4	7,20		26	13	3,09	3,33
11	5	6,48	6,44	27	13	3,56	
12	5	6,40		28	14	3,41	3,41
13	6	4,95		*29*	*15*	*3,13*	*3,13*
14	6	6,77	5,56	30	20	2,53	2,53
15	6	5,53					
16	6	4,99					

Wie man aus der Tabelle ersieht, bemerkt man anfangs, am zweiten bis dritten Tage, eine leichte Steigerung der elektrischen Leitfähigkeit. Dann findet vom vierten bis fünften Tage an eine Abnahme der Leitfähigkeit statt, die besonders prägnant vom fünften bis zum zehnten Tage ist. Man darf jedoch nicht annehmen, daß sich die Gesamtmenge der Elektrolyte in demselben Grade verringert wie die Leitfähigkeit, wie das seinerzeit noch *Bellini* vermutete.

Arrhenius (2) hat klargestellt, daß das Hinzufügen der Nichtelektrolyte zur Lösung deren Leitfähigkeit herabsetzt. *Bugarski* und *Tangl* (9) haben in ihrer Arbeit gezeigt, daß Eiweißsubstanzen auch die elektrische Leitfähigkeit der Lösung herabsetzen. Aus ihren Versuchen haben sie den Schluß gezogen, daß je 1 Proz. Serumalbumin die Leitfähigkeit der Lösung um 1,82 bis 3,54 Proz. (im Durchschnitt um 2,5 Proz.) herabsetzt. *Jackson* und *Bothera* (21) geben bei der Untersuchung der Leitfähigkeit der Milch eine Korrektion von 2,77 Proz. auf 1 Proz. Albumin. Endlich geben *Gram* und *Cullen* (13) für das Blutserum eine Herabsetzung von 2,2 Proz. auf 1 Proz. Albumin. *Atchley* und *Nichols* (3) modifizierten die Formeln, die *Bugarski* und *Tangl*, sowie später *Gram* und *Cullen* angewandt hatten. Sie glaubten, die elektrische Leitfähigkeit des abdialysierten Albumins sei nur von Eiweißionen abhängig, während in Wirklichkeit ein Teil der Elektrolyte nur durch Elektrodialyse entfernt werden kann (*Pauli*). Daher werde ich auf all diese Erörterungen nicht eingehen.

Alle oben genannten Autoren arbeiteten mit Flüssigkeiten, die eine geringe Eiweißmenge (weniger als 10 Proz.) enthielten. Bei größerem Eiweißgehalt besteht natürlich keine Linienabhängigkeit zwischen der Menge der Eiweißstoffe und der Korrektion für die elektrische Leitfähigkeit. Für andere Nichtelektrolyte (Alkohole, Aceton, Harnstoff, Rohrzucker usw.) ist von *Arrhenius* (2) erwiesen, daß mit

großer Annäherung die elektrische Leitfähigkeit der Lösung, welche die Nichtelektrolyte enthält, durch folgende vereinfachte Interpolationsformel ausgedrückt werden kann:

$$l = l_0 \left(1 - \frac{\alpha}{2} x\right)^2.$$

Dabei ist l die elektrische Leitfähigkeit der Lösung, die x Vol.-Proz. der Nichtelektrolyte enthält, und l_0 die elektrische Leitfähigkeit der reinen Lösung, α der Koeffizient, der von der Art der Elektrolyte der Lösung abhängt und von der Art der Nichtelektrolyte, welche zur Lösung hinzugefügt werden.

Der Mechanismus des Einflusses der Eiweiße auf die elektrische Leitfähigkeit der Flüssigkeit muß noch komplizierter sein, da die Eiweißstoffe selbst schwach dissoziierende Elektrolyte vorstellen. Als Elektrolyte müssen sie die Leitfähigkeit etwas erhöhen. Die Erscheinungen der chemischen Bindung [*Bugarski* und *Liebermann* (8), *Ringer* (28)], die Adsorptionserscheinungen, verringern die Anzahl der freien Ionen oder ändern ihre Verteilung. Da die Eiweißteilchen ein gewisses Volumen einnehmen, steigern sie einerseits die Konzentration der intermicellaren Flüssigkeit, andererseits bilden sie ein Hindernis für die sich bewegenden Ionen [„nichtlösender Raum" — *Polanyi* (27), *Augsberger* (4)]. Es verändert sich die innere Reibung, es ändert sich auch die dielektrische Konstante [*Hafner* (14), *Blüh* (7)]. Anders ausgedrückt, tritt dabei eine Reihe mechanischer, elektrostatischer und elektrokinetischer Faktoren auf. Die völlige Abhängigkeit zwischen der elektrischen Leitfähigkeit und dem Eiweißgehalt muß sich in Form einer sehr komplizierten Funktion mit großen Potenzen der unabhängigen Variablen und mit einer Reihe von Koeffizienten äußern, welche vom Charakter des Eiweißstoffes und dem Charakter und der Menge der Elektrolyte abhängen. Da man die großen Potenzen im Falle eines nicht großen Prozentgehaltes des Eiweißes verwerfen kann, so kann man sich für die erste Annäherung der Quadratgleichung bedienen. Wir versuchten insbesondere die Formel von *Arrhenius* mit einigen Veränderungen anzuwenden. Als vergleichende Größe nahm man nicht l_0 (elektrische Leitfähigkeit der reinen Lösung, welche dieselbe Menge Elektrolyte im Volumen der untersuchten Flüssigkeit enthält), sondern l_i (die elektrische Leitfähigkeit der intermicellaren Flüssigkeit, d. h. die Leitfähigkeit der Lösung, welche dieselbe Menge Elektrolyte im Volumen der ganzen Flüssigkeit minus das vom Eiweiß selbst eingenommene Volumen enthält). Endlich versteht man unter x den Gewichtsprozentsatz der Eiweißstoffe und nicht ihr Volumprozent. Zwischen l_0 und l_i muß folgende Abhängigkeit vorliegen: $\frac{l_0}{l_i} = \frac{V - v_{N.R}}{V}$, wo V das Gesamtvolumen und $v_{N.R}$ das Volumen

des nichtlösenden Raumes — eines von *Polanyi* (27) eingeführten und von *Augsberger* entwickelten Begriffs — vorstellt.

Für die Feststellung des Koeffizienten sind Versuche mit lange dauernder Dialysation des Eiereiweißes in Collodiumhülsen oder in *Abderhalden*schen Hülsen angestellt worden. Bestimmt wurde nach Einstellung des Gleichgewichts die elektrische Leitfähigkeit der inneren und äußeren Flüssigkeit und der Prozentgehalt der festen Substanzen. Bei sehr lange dauernder Dialysation ging in das Dialysat eine größere oder geringere Menge Eiweißstoffe über. Sie wurde durch Berechnung der Menge fester Substanzen und der elektrischen Leitfähigkeit festgestellt. Die Berechnung wurde dementsprechend komplizierter.

Tabelle VI.

Einfluß des Eiweißgehalts auf die elektrische Leitfähigkeit.

Nr.	Proz. fester Substanzen	Feste Substanzen Proz.	$10^3 \cdot \varkappa$	α berechnet	Art der Elektrolyte
1	Dialysat	0,82	8,91	0,023	Elektrolyte des Eiereiweißes
	Eiereiweiß	10,28	7,09		
2	Dialysat	2,27	11,8	0,022	Elektrolyte des Eiereiweißes + KCl
	Eiereiweiß	21,43	7,38		
3	Dialysat	5,63	6,54	0,022	Elektrolyte des Eiereiweißes
	Eiereiweiß	27,60	3,90		
4	Dialysat	5,74	74,7	0,024	Elektrolyte des Eiereiweißes + KCl
	Eiereiweiß	21,27	49,6		
5	Dialysat	7,23	84,4	0,023	Elektrolyte des Eiereiweißes + KCl
	Eiereiweiß	25,58	52,8		
6	Dialysat	5,84	68,4	0,025	Elektrolyte des Eiereiweißes + KCl
	Eiereiweiß	26,54	37,4		
7	Dialysat	10,22	129,0	0,025	Elektrolyte des Eiereiweißes + KCl
	Eiereiweiß	34,43	60,8		

Außerdem wurde noch folgender Versuch angestellt:

Das dialysierte und im Vakuum eingedampfte Eiereiweiß ist mit der Lösung des Chlorkaliums vermischt. Eiweißsubstanzen 16,87 Proz., $\varkappa = 9{,}94 \cdot 10^{-3}$, die elektrische Leitfähigkeit, nach der Leitfähigkeit des dialysierten Eiereiweißes und nach der Leitfähigkeit des Chlorkaliums berechnet $12{,}58 \cdot 10^{-3}$, wenn man das spezifische Volumen des Eiweißes für 0,8 (*Polanyi*) annimmt, ist $\alpha = 0{,}021$.

Wenden wir uns den erhaltenen Ergebnissen zu, so müssen wir bemerken, daß sie vorerst nur eine orientierende Bedeutung haben. Es ist ein gewisser Fehler bei Bestimmung der Eiweißstoffmengen nach dem Gehalt an festen Substanzen und der Leitfähigkeit möglich, sodann kann das Eiereiweiß in verschiedenen Abschnitten kleine Schwankungen im Prozentgehalt der festen Substanzen aufweisen. Ferner darf man nicht die Konzentration des Dialysats mit der Konzentration der intermicellaren Flüssigkeit identifizieren. Man muß

hierbei den *Donnan*schen Effekt in Betracht ziehen. Seinen Einfluß auf die Elektrolyte unter den Bedingungen des Blutserums bewertet *Hecht* (17) mit 19 cm Wassersäule, was ungefähr 0,02 Atmosphären beträgt. Ist das Eiereiweiß, das eine große Eiweißmenge enthält, im Gleichgewicht, so muß dieser Einfluß noch größer sein. Berücksichtigt man jedoch, daß der osmotische Druck der Elektrolyte des Eiereiweißes über 3 Atmosphären beträgt, so wird dieser Fehler einige Prozente nicht übersteigen. Bei großen Elektrolytmengen (Versuche IV bis VII) wird der Donnaneffekt ausgeschlossen, aber die große Menge der Elektrolyte muß an sich den Koeffizienten verändern.

Für die Konzentration der Elektrolyte, die im Eiereiweiß des Hühnereies beobachtet werden, ist α gleich 0,022 bis 0,023. Zieht man in Betracht, daß die Korrektion für Eiweiß, die von anderen Autoren vorgeschlagen worden ist, in weiten Grenzen schwankt (1,84 bis 3,54) und dabei für Fälle mit großem Gehalt an festen Substanzen nicht anwendbar ist, so muß man zugeben, daß die Formel $l = l_i \left(1 - \frac{\alpha}{2}\chi\right)^2$ ziemlich zufriedenstellend die beobachteten Verhältnisse wiedergibt. Eine genauere Prüfung der beschriebenen Verhältnisse ist notwendig und muß den Gegenstand einer besonderen Arbeit bilden.

Berechnet man die elektrische Leitfähigkeit der intermicellaren Flüssigkeit des Eiereiweißes an den verschiedenen Entwicklungstagen, so erhält man die folgende Kurve (Abb. 1):

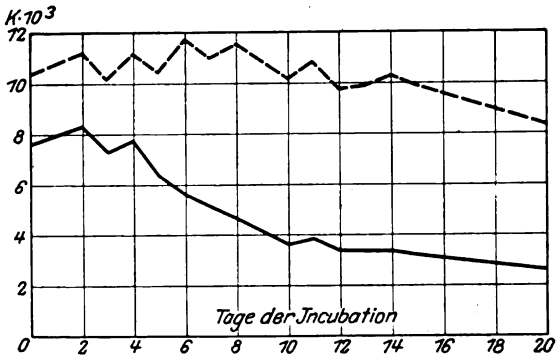


Abb. 1.

—— Elektrische Leitfähigkeit des Eiereiweißes der intermicellaren Flüssigkeit.

----- Elektrische Leitfähigkeit, berechnet nach der Formel $l_i = \frac{e}{\left(1 - \frac{\alpha}{2}\chi\right)^2}$.

Die angeführten Kurven ergeben folgendes: Extrapoliert man zu einem noch größeren Eiweißgehalt, so verändert sich die Intermicellarflüssigkeit — dasjenige Medium, welches tatsächlich die resor-

bierenden serösen Membranen der Frucht umspült — in bezug auf die Gesamtmenge der Elektrolyte fast gar nicht. Eine raschere Entfernung der Elektrolyte aus dem Eiereiweiß als die des Wassers tritt nicht ein. Die Resorption des Wassers und der Elektrolyte verläuft ungefähr parallel.

IV.

Nachdem die Angaben über die elektrische Leitfähigkeit mit genügender Ausführlichkeit geprüft worden waren, veranlaßte uns die starke Herabsetzung der Leitfähigkeit, die Frage nach dem osmotischen Druck des Eiereiweißes in den letzten Tagen der Inkubation wieder erneut in Angriff zu nehmen. Über die ersten Tage der Inkubation existiert eine eingehende Arbeit von *Bialaszewicz* (6).

Nach seinen Angaben beträgt die Depression des Gefrierpunkts bei frischen Eiern 0,423 bis 0,460, am sechsten Tage 0,429 bis 0,443, am achten Tage 0,444. Wir haben die Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung für das Eiereiweiß frischer Eier und für Eier am 8. bis 14. Entwicklungstage ausgeführt.

Methodik.

Wir benutzten den üblichen Apparat von *Beckmann*. Das Thermometer wurde durch n/10 KCl-Lösung geprüft, dessen Depression mit 0,345° C angenommen ist [*Hamburger* (15), Tabelle von *Loomis*]. Man goß 10 bis 12 ccm Eiereiweiß bis 0,5 cm über den oberen Rand des Thermometerreservoirs. Die Temperatur der Kältemischung betrug 4 bis 5° unter Null. Die Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung frischer Eier geschah ohne Schwierigkeiten.

Die Bestimmung der Gefrierpunktsdepression des zähen, an festen Substanzen reichen Eiereiweißes am 10. bis 14. Tage der Inkubation begegnete einer Reihe von Schwierigkeiten. Die erste bestand darin, daß die mit der Geschwindigkeit einer Bewegung in der Sekunde empfohlene Vermischung eine wahrnehmbare Erwärmung des Eiereiweißes nach sich zieht. Der Thermometermeniskus bleibt nicht stehen, sondern beginnt, wenn auch äußerst langsam, zu steigen. Um diese Erscheinung zu vermeiden, wandten wir bei der Vermischung den Rhythmus einer Bewegung in 2 Sekunden an. Ferner muß die Differenz zwischen der Temperatur der Kältemischung und der des Eierweißes den Gefrierpunkt etwas herabsetzen [*Nernst* (25), *Hamburger* (15), „Konvergenztemperatur"]. Die Anwendung von Kryohydratgemischen ($FeSO_4$) mißlang, da in diesen Fällen nach der Überkühlung bis zur Temperatur des Kryohydratgemisches der Quecksilbermeniskus des Thermometers so langsam stieg, daß es unmöglich war, einen Punkt seines Stillstandes festzustellen. Endlich noch ein dritter Umstand — a priori: Bei der Wassergefrierung wird die entstehende Wärme nicht nur für die Erwärmung des überkühlten Wassers, sondern auch für die der überkühlten Teilchen des Eiweißes verbraucht werden, was zu einer gewissen Konzentrierung der Flüssigkeit führen muß, ehe der Gefrierpunkt erreicht wird.

Der erste Faktor ist seiner Wirkung nach den beiden letzten entgegengesetzt, auf diese Weise kommt eine gewisse gegenseitige Neutralisation zustande, aber zweifellos kann der Fehler einige hundertstel Grade betragen.

Die Angaben für frische Eier befinden sich innerhalb der Grenzen der von *Bialaszewicz* angeführten Werte.

Tabelle VII.

Depression des Gefrierpunkts des Eiereiweißes frischer Eier.

Nr. der Eier	°C	Nr. der Eier	°C
1	0,415	4	0,478
2	0,438	5	0,438
3	0,428		

Man erhält für die Eier in den letzten Tagen des Vorhandenseins des Eiereiweißes etwas höhere Zahlen.

Tabelle VIII.

Depression des Gefrierpunkts des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier.

Nr.	Inkubationstage	Anzahl der Eier	°C	Nr.	Inkubationstage	Anzahl der Eier	°C
1	8	5	0,464	6	12	3	0,48
2	9	4	0,49	7	12	4	0,48
3	10	4	0,49	8	13	6	0,49
4	11	6	0,47	9	13	4	0,50
5	11	3	0,49	10	14	9	0,48

Zieht man alle methodischen Schwierigkeiten in Betracht, so kann die Schlußfolgerung von *Bialaszewicz* — geringe Veränderung des osmotischen Druckes des Eiereiweißes in den ersten 6 bis 8 Tagen der Entwicklung — auch auf die folgenden Tage übertragen werden.

Wenn eine geringfügige Veränderung vorliegt, so liegt sie im Sinne einer Steigerung der Depression. Da im frischen Ei der Hauptteil des osmotischen Druckes durch Elektrolyte bedingt ist und bei der Inkubation eine große Menge von Nichtelektrolyten sich nicht bildet, dagegen ein Teil der Nichtelektrolyte (Zucker) verschwindet, so bestätigen diese Angaben noch einmal die Erwägungen, die im Kapitel über die elektrische Leitfähigkeit des Eiereiweißes entwickelt sind. Die intermicellare Flüssigkeit wird an Elektrolyten fast gar nicht ärmer.

Wenn man einen hohen Dispersionsgrad der Eiweißsubstanzen des Eiereiweißes annimmt, so ist es möglich, daß einige hundertstel Grade durch die Kapillarität des Systems bedingt sind [*Bechhold, Bachmetjew*, zitiert nach *Ostwald* (26)].

V.

Bei der Entwicklung des Hühnereies verändert sich auch die Reaktion des Eiereiweißes, d. h. die Wasserstoffionenkonzentration in demselben.

Die Wasserstoffionenkonzentration im Eiereiweiß des sich entwickelnden Hühnereies stellte *Aggazzotti* (1) fest. Für das frische Ei gibt er die Werte p_H 7,96 bis 8,99 an. Am elften Tage überschreitet die Reaktion den Neutralpunkt, und nach 14 Tagen sinkt p_H bis 6,14. Die titrierte Alkalinität bei α-Naphtholphthalein als Indikator (Umschlag der Farbe bei p_H 7,20 bis 8,60) ist beim frischen Ei 1,3 ccm n/100 H_2SO_4 auf 1 g des Eiereiweißes, nach 8 bis 7 Tagen der Inkubation 0. Später zeigt das Eiereiweiß schon eine gewisse Acidität, welche am 14. Tage 2,02 ccm n/100 NaOH auf 1 g Eiereiweiß erreicht.

Es entsteht die Frage, wieweit dieser Reaktionswechsel von der Anhäufung der Kohlensäure und inwieweit er von nicht flüchtigen Säuren abhängt. So erwies *Tomita* (31) eine Zunahme der Milchsäure bis zum fünften Tage von 0,0058 bis 0,0763 Proz.; am 14. Tage wird der Gehalt an Milchsäure wieder sehr klein. Angaben über andere Säuren fanden wir nicht. Um diese Frage zu lösen, führten wir die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration [Grundwasserstoffzahl — *Ylppö* (23), *Höber* (19)] im Eiereiweiß aus, das durch lange dauernde Wasserstoffdurchleitung von CO_2 befreit worden war.

Methodik.

Wir benutzten die *Lehmann*sche Mikroelektrode [*Lehmann* (23)]. Wie aus der Arbeit von *Wladimiroff* und *Galwialo* (32) hervorgeht, besitzt diese Elektrode besondere Vorteile für die Bestimmung des p_H in sehr zähen Flüssigkeiten und in Gallerten, weiter wird bei lange dauernder Wasserstoffdurchleitung die Kohlensäure ebenso vollkommen entfernt, wie auch bei der vorläufigen Entfernung der Gase im Vakuum. Das Potential stellt sich nach 3 bis 5 Stunden auf konstante Höhe ein. Der Sicherheit wegen wiederholte man die Bestimmung im Laufe von 2 bis 3 Stunden nach der Einstellung des Potentials, so daß die gesamte Dauer jedes Versuchs 6 bis 8 Stunden betrug. Die Messungen sind in der üblichen Vorrichtung nach *Michaelis* bei der Temperatur 15 bis 18° C ausgeführt.

Tabelle IX.

Wasserstoffionenkonzentration (p_H) im Eiereiweiß sich entwickelnder Hühnereier nach Entfernung der CO_2 (Grundwasserstoffzahl).

Nr.	Inkubationstage	p_H	Nr.	Inkubationstage	p_H
1	2	9,29	14	10	7,78
2	2	9,30	15	11	7,88
3	2	9,50	16	12	7,55
4	3	9,32	17	13	7,31
5	3	9,62	*18*	*13*	*7,67*
6	4	9,13	19	15	7,57
7	4	9,22	20	16	7,61
8	5	8,72	21	20	6,89
9	6	8,66			
10	7	8,57		Unbefruchtete Eier	
11	8	7,88	1	9	9,38
12	9	8,29	2	19	8,90
13	10	7,88	3	21	8,88

Aus unseren Angaben geht hervor, daß, während das p_H des Eiereiweißes sich nicht entwickelnder Eier keine starken Veränderungen erleidet, bei den sich entwickelnden Eiern eine Veränderung im Sinne der Abnahme der Alkalinität zustande kommt, was bereits von *Aggazzotti* erwiesen worden ist. In Ergänzung zu seinen Angaben kann man folgende Schlußfolgerungen ziehen. Bei Entfernung der CO_2 überschreitet das Eiereiweiß selbst nach 16 Inkubationstagen den Neutralpunkt nicht. Jene Acidität, welche *Aggazzotti* elektrometrisch und durch Titration mit α-Naphtholphthalein bestimmte, hängt von der Kohlensäure ab. Die Abnahme der Alkalireserve läßt sich entweder durch ihren Übergang in den Körper des Embryos oder durch eine Zunahme des Gehalts an irgendwelchen organischen Säuren, oder durch Bindung der Alkalireserve durch Eiweißsubstanzen des Eiereiweißes erklären. Letzteres ist deswegen wahrscheinlich, weil die Eiweißsubstanzen Ampholyte mit dem isoelektrischen Punkte bei p_H 5 bis 6 vorstellen, d. h. mit dem Überwiegen der Säuregruppen; die beträchtliche Zunahme der Eiweißkonzentration muß sich in der Reaktion äußern.

Es ist möglich, daß die Eiweißsubstanzen außerdem die Kohlensäure fest binden und auf diese Weise nun indirekt die Reaktion beeinflussen.

VI.

Bei Zusammenfassung der erhaltenen Daten ergibt sich folgendes Bild der Veränderungen bei der Entwicklung des Hühnereies. Von den ersten Tagen der Entwicklung an beginnt das Wasser, energisch zu wandern. In den ersten Entwicklungstagen geht das Wasser aus dem Eiereiweiß in den Embryo über, von dort in den Dotter und in die Fruchtnebenhöhlen. Vom zehnten Tage an geht das Wasser aus dem Eiereiweiß und aus dem Dotter in den Embryo und von dort in die Fruchtnebenhöhlen über. In den letzten Entwicklungstagen tritt das Wasser aus den Fruchtnebenhöhlen in den Embryo zurück. Im Laufe der ganzen Zeit der Inkubation kommt parallel der Wanderung des Wassers ein Verlust durch die Eischale infolge Verdunstung zustande. Diese Wasserwanderung muß mit dem Aufwand einer bestimmten Arbeit verbunden sein. Besonders beträchtlich muß diese Arbeit bei der Wasserresorption aus dem an festen Stoffen reichen Eiereiweiß in der zweiten Entwicklungswoche sein.

Die Wasserstoffionenkonzentration verändert sich im Eiereiweiß nach der für die Wasserresorption günstigen Seite. Sie verändert sich nämlich nach der Seite der Herabsetzung des p_H hin, d. h. im Sinne der Annäherung an den isoelektrischen Punkt der Eiweißsubstanzen, bei welchem der Verlust der Quellungsfähigkeit der Eiweißstoffe am leichtesten vor sich geht.

Die vom Standpunkt ihrer Gesamtmenge aus betrachteten Elektrolyte scheinen eine dem Wasser ähnliche Bahn zurückzulegen. Die große Herabsetzung der elektrischen Leitfähigkeit bereitete seinerzeit *Bellini* große Schwierigkeiten hinsichtlich der Erklärung dieser Tatsache.

Von zwei Voraussetzungen verwirft er die erste über die Bildung nicht dissoziierender Eiweißsalze auf Grund der Versuche von *Fano* und *Enriquez* und neigt sich mehr der zweiten zu: der Embryo schöpft die Salze aus dem Dotter, und in den Dotter treten die Salze aus dem Eiereiweiß ein, welches somit an Elektrolyten ärmer wird. Hinsichtlich der elektrischen Leitfähigkeit des Eiereiweißes geben wir durch Präzisierung und Erweiterung der Angaben von *Bellini* eine ganz andere Erklärung dieser Tatsache.

Wenn wir in bezug auf die Gesamtmenge der Elektrolyte Wanderungen ähnlich der Wasserwanderung bemerken, so müssen wir hinsichtlich des Übergangs einzelner Ionen aus den einen embryonalen Stoffen in die anderen kompliziertere Verhältnisse erwarten — Erscheinungen der ungleichen Geschwindigkeit der Resorption und Ausscheidung, Erscheinungen des Ionenumsatzes, -wechsels usw.

Nach den von uns festgestellten Angaben über die Leitfähigkeit des Eiereiweißes der amnialen und allantoiden Flüssigkeit unterscheiden sie sich voneinander, was von der Abgeschlossenheit dieser Systeme zeugt. Dadurch wird auch die an sich wenig wahrscheinliche Behauptung von *Hirota* [zitiert nach *Bywaters* (10)] über die Kommunikation des Eiereiweißes vom 11. Tage an mit der amnialen Höhle und über die Möglichkeit der Resorption des Eiereiweißes durch die letztere widerlegt.

Die Erscheinungen der Resorption der Eiereiweißbestandteile, die Erscheinungen der Ausscheidung der Bestandteile der Fruchtnebenhöhlen und ihrer partiellen Rückresorption erfordern einen Arbeitsaufwand. Daher muß man den Begriff von *Tangl* (29) über die Entwicklungsarbeit detaillieren, indem man die für die Resorption und Ausscheidung verschiedener Produkte und die für die Synthese der Gewebe des Körpers aus dem Nährmaterial erforderliche Arbeit unterscheidet („Neubildungsarbeit" und „Wachstumsarbeit"), sowie die für die Erhaltung der Lebensfähigkeit der letzteren nötige „Erhaltungsarbeit" (30).

Somit haben wir eine Reihe höchst interessanter Probleme vor uns, welche den Gegenstand unserer weiteren Arbeit bilden werden.

Schlußfolgerungen.

1. Die Menge der festen Substanzen im Eiereiweiß sich entwickelnder Hühnereier wächst in den letzten Tagen des Vorhandenseins des Eiereiweißes bis zu 40 Proz. an.

2. Die Menge der festen Substanzen des Dotters verringert sich in der ersten Woche stark, nach dem zehnten Tage kehrt sie zur ursprünglichen Norm zurück und übersteigt am Schluß der Inkubation den Anfangswert.

3. Der Übergang des Wassers aus dem einen Stoff des Eies in den anderen geschieht durch den Körper des Embryos.

4. Die elektrische Leitfähigkeit des Eiereiweißes fällt bei der Entwicklung von $7{,}6 \cdot 10^{-3}$ im Beginn der Inkubation auf $3 \cdot 10^{-3}$ zum Schluß des Vorhandenseins des Eiereiweißes.

5. Bei großen Konzentrationen des Eiweißstoffes ist die Linienabhängigkeit zwischen der elektrischen Leitfähigkeit und der Eiweißmenge (*Tangl und Bugarski* u. a.) nicht anwendbar.

Die Anwendung der entsprechend abgeänderten Formel von *Arrhenius* gab für die Intermicellarflüssigkeit befriedigende Resultate.

6. Im Gesamtgehalt der Elektrolyte in der Intermicellarflüssigkeit des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier kommen große Veränderungen nicht zustande.

7. Der osmotische Druck des Eiereiweißes, welcher nach der Depression des Gefrierpunktes bestimmt wird, wird zum Schluß des Vorhandenseins des Eiereiweißes etwas erhöht.

8. Die Wasserstoffionenkonzentration steigt im Eiereiweiß bei der Inkubation. Die Grundwasserstoffzahl, d. h. p_H nach der Entfernung der Kohlensäure, ist bis zum 16. Inkubationstage beständig höher als 7,0, obgleich sie die ganze Zeit abnimmt.

Zum Schluß spreche ich Herrn Prof. Dr. *M. D. Iljin* meinen tiefen Dank für die vorgeschlagene Arbeit und die Anleitung aus. Herrn Dr. *M. J. Galwialo* danke ich herzlich für die ständige Hilfe und Anleitung bei der Arbeit.

Literatur.

1) *Aggazzotti*, Arch. f. Entwicklungsmech. **37**, 1, 1913. — 2) *Arrhenius*, Zeitschr. f. physik. Chem. **9**, 487, 1892. — 3) *Atchley* and *Nichols*, Journ. of biol. Chem. **65**, 729, 1925. — 4) *Augsberger*, Ergebn. d. Physiol. **25**, 618, 1925. — 5) *Bellini*, Arch. di Fisiol. **4**, 123, 1907. — 6) *Bialaszewicz*, Arch. f. Entwicklungsmech. **34**, 489, 1912. — 7) *Blüh*, Physik. Zeitschr. **1926**, Nr. 8, S. 226. — 8) *Bugarski* und *Liebermann*, Pflügers Arch. **72**, 121, 1898. — 9) *Bugarski* und *Tangl*, ebendaselbst **72**, 531, 1898. — 10) *Bywaters*, diese Zeitschr. **55**, 245, 1913. — 11) *Foster* and *Balfour*, Elemente der Embryologie (russische Übersetzung). Petersburg 1880. — 12) *Freundlich*, Kapillarchem. 1920, 2. Aufl. — 13) *Gram* and *Cullen*, Journ. of biol. Chem. **57**, 477, 1923. — 14) *Hafner*, Ergebn. d. Physiol. **25**, 566, 1925. — 15) *Hamburger*, Osmot. Druck und Ionenlehre in den medizinischen Wissenschaften **1**, 1902, Wiesbaden. — 16) *Hasselbalch*, Skand. Arch. f. Physiol. **10**, 413, 1900. —

17) *Hecht*, diese Zeitschr. **165**, 214, 1925. — 18) *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 5. Aufl., 1924, Leipzig. — 19) *Derselbe*, Deutsch. med. Wochenschr. 1917, Nr. 18, S. 551. — 20) *Iljin*, Untersuchungen über die Entwicklung des Hühnerembryos 1917, Petrograd (russ.). — 21) *Jackson* and *Rothera*, Biochem. Joun. 8, 1914. — 22) *Kohlrausch* und *Holborn*, Das Leitvermögen der Elektrolyte usw. 1898, Leipzig. — 23) *Lehmann*, diese Zeitschr. **139**, 213, 1923. — 24) *Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration, 2. Aufl. (russ. Übersetz.). — 25) *Nernst*, Theoretische Chemie, **1904**. St. Petersburg. — 26) *Wo. Ostwald*, Die Welt vernachlässig. Größen, **1923** (russ. Übersetz.). — 27) *Polanyi*, diese Zeitschr. **104**, 237, 1920. — 28) *Ringer*, H. S. **130**, 270, 1923. — 29) *Tangl*, Pflügers Arch. **93**, 327, 1902. — 30) *Derselbe*, ebendaselbst **130**, 1. — 31) *Tomita*, diese Zeitschr. **116**, 1, 1921. — 32) *Wladimiroff* und *Galwialo*, diese Zeitschr. **160**, 101, 1925. — 33) *Ylppö*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **14**, 266, 1916.

Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie.

II. Mitteilung:

Zucker-, Rest- und Gesamtstickstoffgehalt im Eiereiweiß sich entwickelnder Hühnereier[1]).

Von

G. E. Wladimiroff und A. A. Schmidt.

(Aus dem Laboratorium für physiologische Chemie an der militärmedizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 7. August 1926.)

Im Verlauf der 21 Tage der Inkubation vollziehen sich im Hühnerei chemische Prozesse, die mit der Verteilung und der Umwandlung der Ausgangsstoffe zusammenhängen. Eine Reihe physikalisch-chemischer Veränderungen ist von einem von uns in der vorhergehenden Mitteilung beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit sind die Veränderungen des Eiereiweißes in bezug auf den Gehalt an freiem Zucker sowie an Rest- und Gesamtstickstoff untersucht worden.

Zucker des Eiereiweißes.

Kojo (1) gibt für das Eiereiweiß frischer Hühnereier einen durchschnittlichen Zuckergehalt von 0,55 Proz. an. Parallel ausgeführte Bestimmungen nach der Reduktions- und Gärungsmethode ergaben Werte, die nur innerhalb der Fehlergrenzen des Versuchs differieren. *Mörner* (2), der zugleich polarimetrisch und mit der Reduktionsmethode nach *Fehling* gearbeitet hat, bestätigte, daß die reduzierenden Substanzen des Eiereiweißes mit Glucose identisch sind. Der Zuckergehalt beträgt nach *Mörner* 0,40 bis 0,46 Proz. *Tomita* (3) fand im Eiereiweiß im Durchschnitt 0,47 Proz.

Methodik.

Wir begnügten uns mit einer einzigen — der Reduktionsmethode. Anfänglich bedienten wir uns der Methodik von *Hagedorn-Jensen* (4).

Wir nahmen Gewichtsproben von 0,5 bis 1,0 g, zu je 0,1 g fügte man so viel sedimentierendes Gemisch hinzu, wie man für 0,1 ccm Blut

---

[1]) Mitgeteilt am 27. Mai 1926 auf dem zweiten allrussischen Physiologenkongreß.

braucht (n/10 NaOH 1 ccm, 0,45 proz. $ZnSO_4$ 5 ccm). Bei großer Zähigkeit des Eiereiweißes, was in den letzten Tagen seines Vorhandenseins beobachtet wird, wurde es vorläufig mit einer geringen Menge physiologischer Kochsalzlösung vermischt. Nach der Sedimentierung der Eiweißstoffe und der Verdünnung des Filtrats auf ein bestimmtes Volumen (100 bis 200 ccm), nahmen wir für die Analyse Portionen von 12 ccm. Die weiteren Manipulationen wurden in der üblichen Weise ausgeführt.

Da die in den letzten Tagen des Vorhandenseins des Eiereiweißes nach der Methode von *Hagedorn-Jensen* erhaltenen Werte große Differenzen gegenüber den Kontrollbestimmungen ergaben, wandten wir außerdem ein anderes Verfahren — die *Bertrand*sche (5) Methode in der Modifikation von *Michaelis* (6) — an. Die Gewichtsprobe des Eiereiweißes nahm man ungefähr zu 1 g. Alle Manipulationen wurden genau nach den Vorschriften von *Michaelis* ausgeführt. Einige Schwierigkeiten bot mitunter das Sedimentieren der Eiweißsubstanzen. Indem wir innerhalb enger Grenzen die Konzentration des Ferrum oxyd. dialys. variierten, konnten wir stets ein völlig durchsichtiges farbloses Filtrat erzielen. Die Kontrollbestimmungen ergaben immer ein befriedigendes Resultat.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle I angeführt.

Tabelle I.

Zucker des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier.

Nr.	Inkubationstage	Zucker in mg-Proz. (Mittel aus zwei Gewichtsproben)	Nr.	Inkubationstage	Zucker in mg-Proz. (Mittel aus zwei Gewichtsproben)
1	0	439	9	8	169
2	0	406	10	9	fehlt
3	4	435	11	9	100
4	4	334	12	10	fehlt
5	6	285	13	12	„
6	6	403	14	16	„
7	7	280	15	18	„
8	8	150			

Wie man aus der Tabelle ersieht, fällt die Menge des im Eiereiweiß befindlichen Zuckers rasch ab. Am 10. bis 11. Tage läßt sich nach der Methode von *Michaelis* kein Zucker mehr feststellen. Vergleichen wir unsere Ergebnisse mit den Daten der Literatur, so müssen wir die Arbeit von *Bywaters* (7) beachten.

Dieser Autor bestimmte den Zucker des Eiereiweißes nach der Methode von *Pavy* und erhielt für frische Eier 0,32 Proz., einen niedrigeren Wert als den von uns erhaltenen. Im Laufe der ersten Inkubationstage fiel bei ihm die Zuckermenge schroff ab und war am siebenten Tage gleich Null. In unseren Untersuchungsobjekten entdeckten wir Zucker bis einschließlich zum neunten Tage. Wir sind geneigt, anzunehmen, daß dieses frühe

Verschwinden durch die Unvollkommenheit der Methodik bedingt sei. *I. D. Gadaskina* (8), die in unserem Laboratorium an denselben Objekten mit der Methode von *M. J. Galwialo* (9) gearbeitet hatte, stellte minimale Zuckermengen auch später während einiger Tage fest, als man nach der Methode von *Michaelis* keine Reduktion mehr nachweisen konnte.

Die nach der Methode von *Hagedorn-Jensen* erzielten Werte schwankten für die ersten Tage innerhalb 400 bis 500 mg und stimmten gut mit den Kontrollbestimmungen überein. In der zweiten Inkubationswoche schwankten die Zahlen zwischen 150 und 300 mg, wobei die Kontrollproben große Differenzen aufwiesen. Der Versuch mit dialysiertem und im Vakuum eingedampftem Eiereiweiß (bis zu einem Gehalt an festen Substanzen von 16,8 Proz.) ergab 157 mg Zucker. Das gegenseitige Verhältnis des Zinkoxydhydrats und des Eiereiweißes ist wohl für die vollständige Sedimentierung der Eiweißstoffe ungenügend.

Dagegen gibt die Anwendung der Methode von *Hagedorn-Jensen* am Eidotter trotz der darin enthaltenen enormen Mengen fester Substanzen anscheinend befriedigendere Resultate.

Tabelle II.

Die Menge reduzierender Substanzen (auf Zucker umgerechnet) im Dotter der sich entwickelnden Hühnereier.

Nr. der Eier	Inkubationstage	Reduzierende Substanzen (auf Zucker umgerechnet) mg-Proz.	Nr. der Eier	Inkubationstage	Reduzierende Substanzen (auf Zucker umgerechnet) mg-Proz.
1	0	199	15	12	114
2	2	199	16	13	105
3	2	221	17	13	113
4	3	207	18	14	52
5	3	162	19	15	72
6	4	225	20	15	68
7	4	194	21	16	64
8	5	201	22	16	68
9	6	169	23	17	60
10	7	173	24	20	51
11	9	137	25	21	56
12	9	191		22 *)	67
13	10	124	26	—	60
14	11	122			

*) Die Küchlein picken sich durch.

Küchlein.

Nr.	Tage	Reduzierende Substanzen (auf Zucker umgerechnet) mg-Proz.	Nr.	Tage	Reduzierende Substanzen (auf Zucker umgerechnet) mg-Proz.
1	1	60	3	3	69
2	2	57	4	4	58

Nach *Kojo* (1) finden sich im Dotter des frischen Hühnereies im Durchschnitt 0,32 Proz. reduzierender Substanzen, dabei bestimmt man nach der Gärungsmethode 0,20 bis 0,28 Proz. Zucker. Der Unterschied zwischen der ersten und zweiten Zahl muß dem Kreatinin zugeschrieben werden, dessen durchschnittliche Menge auf 0,05 Proz. geschätzt wird. *Tomita* (3) gibt für den Zuckergehalt des Eidotters den Wert 0,24 Proz. an.

Wir erhielten etwas kleinere Zahlen. Es ist interessant, daß der Gehalt an reduzierenden Substanzen, nachdem er — auf Zucker umgerechnet — bis zum 14. Tage auf 0,5 bis 0,7 Proz. gefallen ist, im weiteren bis zum Ende des Vorhandenseins des Dotters und selbst nach dem Herauskriechen des Küchleins aus dem Ei nicht abnimmt. Man muß natürlich annehmen, daß wir es in diesem Falle nicht mit Zucker zu tun haben, der ziemlich rasch verbraucht wird, sondern eben mit Kreatinin.

Rest- und Gesamtstickstoff.

Die Eiweißsubstanzen des Eiereiweißes müssen sich, ehe sie resorbiert werden, in zur Diffusion und Osmose fähige Produkte spalten. Demnach müssen sich im Eiereiweiß proteolytische Prozesse abspielen, bei denen gleichzeitig mit der Resorption der Spaltungsprodukte eine Zunahme des Reststickstoffs auftreten muß.

Methodik.

Der Reststickstoff wurde nach *Bang* bestimmt. Da die sedimentierende Mischung von *Bang* mitunter keine völlige Sedimentierung der Eiweißsubstanzen des Eiereiweißes ergab, wurde als sedimentierendes Mittel 1,6 Proz. essigsaures Uran angewandt. Für das Blut ist dieses Sedimentierungsmittel von *Fischer* (10) benutzt worden. Seine Anwendung geschah in folgender Weise:

Zum Blutvolumen wurde ein gleiches Volumen des 1,6proz. Uranacetats und ein dreifaches Volumen Wasser hinzugefügt. Bei der Arbeit mit Eiereiweiß erwies es sich, daß eine Verdünnung mit Wasser ein Passieren von Eiweißspuren in das Filtrat hervorruft. Daher fügten wir zur Gewichtsprobe des Eiereiweißes 1,6proz. Uranacetat bis 10 ccm, rührten es im Zentrifugengläschen sorgfältig mit einem Glasstäbchen um, verschlossen mit einem Gummistopfen und ließen 24 Stunden stehen. Das Sediment wurde zentrifugiert, die völlig durchsichtige Flüssigkeit wurde auf ein ausgewaschenes Filter abgegossen. Aus dem Filtrat entnahm man die Probe für die Analyse. Die Gewichtsproben nahm man anfangs etwa zu 1 g, in der zweiten Inkubationswoche und später kleinere bis 0,4 g, dabei wurde im letzten Falle vor dem Hinzufügen des Uranacetats mit 0,5 bis 1,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung umgerührt. Die weiteren Manipulationen führte man nach *Bang* aus.

Der Gesamtstickstoff wurde nach *Kjeldahl* bestimmt. Die Resultate sind in den Tabellen III und IV angeführt.

Tabelle III.

Reststickstoff des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier.

Nr.	Inkubationstage	Rest-N in mg-Proz. (Mittel aus zwei Bestimmungen)	Nr.	Inkubationstage	Rest-N in mg-Proz. (Mittel aus zwei Bestimmungen)
1	0	9,3	12	8	14,5
2	0	7,2	13	8	12,1
3	0	7,8	14	8	12,9
4	0	6,4	15	10	20,3
5	2	9,3	16	10	15,9
6	4	8,6	17	12	22,4
7	4	7,6	18	12	21,0
8	6	14,7	19	14	24,1
9	6	14,5	20	16	29,5
10	6	14,0	21	16	25,8
11	6	9,8	22	18	50,4

Die Menge des Reststickstoffs beginnt vom vierten Inkubationstage an sich allmählich zu vergrößern, indem sie am 16. Tage Werte erreicht, welche dreimal die für das Eiereiweiß frischer Eier erhaltenen Zahlen übertreffen. Die Angaben von *Tomita* (11), welche den Reststickstoff des Eiereiweißes betreffen, geben dieselbe Gesetzmäßigkeit. Die von ihm angegebenen absoluten Zahlen sind etwas kleiner, was sich wohl durch eine andere Eiweißsedimentierungsmethode erklärt.

Der Gesamtstickstoff nimmt entsprechend der Zunahme fester Substanzen zu.

Tabelle IV.

Gesamtstickstoff des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier.

Nr. der Eier	Inkubationstage	N in Proz. (Mittel aus zwei Bestimmungen)	Nr. der Eier	Inkubationstage	N in Proz. (Mittel aus zwei Bestimmungen)
1	2	1,75	10	10	5,30
2	2	1,68	11	10	5,38
3	4	2,14	12	12	5,75
4	4	2,57	13	12	5,83
5	6	4,40	14	14	5,93
6	6	4,46	15	14	5,49
7	8	5,05	16	14	6,46
8	8	5,32	17	14	5,67
9	10	5,07			

Es ist von Interesse, daß das Verhältnis zwischen dem Reststickstoff und dem Gesamtstickstoff konstant bleibt.

Schlußfolgerungen.

1. Die Zuckermenge nimmt im Eiereiweiß sich entwickelnder Hühnereier ab und erreicht am neunten bis zehnten Tage Werte, die nach der Methode von *Michaelis* nicht mehr bestimmbar sind.

2. Die Methode von *Hagedorn-Jensen* gibt bei großen Konzentrationen fester Substanzen im Eiereiweiß falsche Resultate.

3. Die Menge reduzierender Substanzen im Dotter sich entwickelnder Hühnereier sinkt und erreicht am 14. Tage ein konstantes Niveau.

4. Die Menge des Reststickstoffs des Eiereiweißes wächst bei der Inkubation proportional der Zunahme des Gesamtstickstoffs.

Literatur.

1) *Kojo*, H.-S. **75**, 1, 1911. — 2) *Mörner*, H.-S. **80**, 430, 1912. — 3) *Tomita*, diese Zeitschr. **116**, 22, 1921. — 4) *Hagedorn* und *Jensen*, ebendaselbst **135**, 48, 1923. — 5) *Bertrand*, Bull. Soc. Chim. de Paris **35**, 1285, 1908. — 6) *Michaelis*, diese Zeitschr. **59**, 166, 1914. — 7) *Bywaters*, ebendaselbst **55**, 245, 1913. — 8) *Gadaskina*, ebendaselbst **172**, 447, 1926. — 9) *Galwialo*, Wratschebnaja Gaseta Nr. 24, 1923, S. 514. — 10) *Fischer*, H.-S. **102**, 266, 1918. — 11) *Tomita*, diese Zeitschr. **116**, 12, 1921.

Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie.

III. Mitteilung:

Zucker-, Fett- und Reststickstoffgehalt im Blute des Hühnerembryos [1])

Von

G. E. Wladimiroff und **A. A. Schmidt.**

(Aus dem Laboratorium für physiologische Chemie an der militärmedizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 7. August 1926.)

Das Studium des Kohlehydrat-, Fett- und Eiweißgleichgewichts im Organismus des Embryos bietet ein großes Interesse, da hier der Stoffwechsel anders verläuft als im erwachsenen Zustand. Den ersten Schritt zur Untersuchung dieses Gleichgewichts bildet die Feststellung des Zucker-, Fett- und Reststickstoffgehalts im Blute.

Methodik.

Die Entnahme des Blutes vom Hühnerembryo bereitet große Schwierigkeiten. Das Blut und die Gefäße bilden sich beim Hühnerembryo vom zweiten Tage an. Am vierten Tage sieht man schon deutlich das pulsierende Herz. Nach einigen weiteren Tagen zeichnen sich auf dem Dotter deutlich und schön die mit dem Blute angefüllten Gefäße ab. Zu dieser Zeit ist es überhaupt unmöglich, das Blut in reiner Form zu entnehmen. Die Gefäße sind auf allen Seiten von einer halbflüssigen oder richtiger sogar flüssigen Masse umgeben, aus der heraus sie zu isolieren nicht möglich ist. Außerdem ist die Blutmenge noch zu gering, um die notwendigen Bestimmungen vornehmen zu können. Erst vom 11. Entwicklungstage an, als bereits die Allantoingefäße — die Umbilikalgefäße — stark genug entwickelt waren, gelang es uns, in befriedigender Weise die nötige Blutmenge zu sammeln. Die Technik der Blutentnahme war wie folgt:

Nach dem Öffnen des Eies, dem Riß der serösen Membran und der Übertragung des Embryos in ein flaches Porzellanschälchen fand man die oberhalb des Dotters in der Substanz der Membran verlaufende pulsierende Umbilikalarterie oder ihren großen Zweig auf. Die Membran ringsum wurde

---

[1]) Mitgeteilt am 27. Mai 1926 auf dem zweiten allrussischen Physiologenkongreß.

mit warmem Wasser ausgewaschen und dann sorgfältig mit Filtrierpapier abgetrocknet. Mit einer feinen Schere öffnete man die Arterie. Das herausfließende Blut wurde auf einem entsprechend bearbeiteten und vorläufig gewogenen Filtrierpapier gesammelt. Das Papier wurde sodann auf einer Torsionswage gewogen und der üblichen Bearbeitung unterworfen.

Der Zucker wurde nach *Hagedorn-Jensen*, das Fett und der Reststickstoff nach *Bang* bestimmt.

Tabelle I.

Zuckergehalt im Blute der Hühnerembryonen.

Nr. der Eier	Inkubationstage	Zahl der Gewichtsproben	Zucker mg-Proz.	Durchschnittlich
1	11	2	153	
2	11	1	156	
3	11	1	141	151
4	11	1	158	
5	11	1	148	
6	13	2	148	
7	13	2	152	
8	13	1	154	153
9	13	2	166	
10	13	3	143	
11	13	3	153	
12	14	1	167	
13	14	2	165	164
14	14	2	160	
15	14	1	165	
16	16	3	133	
17	16	3	145	144
18	16	2	155	
19	16	2	141	
20	18	4	138	
21	18	1	142	145
22	18	2	140	
23	18	3	160	
24	20	1	186	
25	20	1	181	
26	20	1	168	
27	20	2	180	175
28	20	1	180	
29	20	1	167	
30	20	1	165	
1	Sich durchpickende Küchlein	3	210	
2	6 Stunden	4	191	216
3	6 „	3	240	
4	30 „	4	222	
5	4 Tage	4	208	205
5	4 „	4	202	

Wie man sieht, ist das Niveau des Zuckers oder richtiger der Gehalt an reduzierenden Substanzen im Blute vom 11. Tage an bis zu den letzten Inkubationstagen ziemlich konstant und etwas niedriger als das Zuckerniveau im Blute des Küchleins vor und insbesondere nach

dem Auskriechen aus dem Ei. Das ausgewachsene Huhn weist nach den Angaben von *Scheunert* und *Pelchrzim* (1) denselben Blutzuckergehalt auf. Die Konstanz des Zuckergehalts gibt Veranlassung, an das Vorhandensein eines den Blutzuckerspiegel regulierenden Mechanismus zu denken. Das Studium dieses Mechanismus muß von besonderem Interesse sein, da die Korrelationen zwischen dem Nervensystem und den endokrinen Drüsen andere als im erwachsenen Organismus sein müssen.

Die Angaben über den Gesamtfettgehalt des Blutes (Extrakt mit Petroläther) sind in der Tabelle II angeführt.

Tabelle II. Fettgehalt im Blute der Hühnerembryonen.

Nr. der Eier	Inkubationstage	Zahl der Gewichtsproben	Fett mg-Proz.	Durchschnittlich
1	11	1	307	292
2	11	1	276	
3	13	3	474	351
4	13	3	334	
5	13	3	315	
6	13	2	386	
7	13	4	285	
8	13	2	310	
9	14	1	325	313
10	14	2	313	
11	14	3	302	
12	15	2	380	391
13	15	3	432	
14	15	2	361	
15	16	1	340	311
16	16	2	283	
17	16	2	304	
18	16	2	309	
19	17	6	547	447
20	17	3	347	
21	18	3	305	359
22	18	1	304	
23	18	1	313	
24	18	1	309	
25	18	3	565	
26	20	1	286	285
27	20	1	283	
28	20	1	281	
29	20	2	290	
1	Sich durchpickende Küchlein 1 Tag	3	293	284
2	1 „	2	273	
3	1 „	2	285	
4	1 „	3	306	
5	1 „	5	396	
6	1 „	6	152	
7	2 Tage	2	195	138
8	2 „	6	82	

Die Fettmenge im Blute überrascht durch ihre Größe. In einigen Fällen übertrifft sie ½ Proz. Weshalb in einzelnen Eiern starke Abweichungen von der durchschnittlichen Größe auftreten, sind wir nicht imstande zu sagen. Der hohe Fettgehalt des Blutes wird verständlich, wenn man in Betracht zieht, daß die Vorräte des während der Inkubation im Ei verbrauchten Nährmaterials hauptsächlich auf Fette entfallen. Wie *Hasselbalch* (2) und *Tangl* (3) in ihren Arbeiten gezeigt haben, wird die für das Wachstum und die Entwicklung des Hühnerembryos notwendige Arbeit durch die auf Kosten der Fettverbrennung entstandene Energie verrichtet. Diese Besonderheit des Stoffwechsels läßt sich in ausgezeichneter Weise durch das Blutbild veranschaulichen. Im Augenblick des Herauskriechens aus dem Ei sinkt der Fettgehalt des Blutes etwas und wird nach dem Auskriechen aus dem Ei noch stärker herabgesetzt.

Tabelle III.

Reststickstoffgehalt im Blute des Hühnerembryos.

Nr. der Eier	Inkubationstage	Zahl der Gewichtsproben	Rest-N mg-Proz.	Durchschnittlich
1	13	2	48	48,5
2	13	2	49	
3	14	2	55	55
4	15	3	46	50
5	15	3	54	
6	16	3	63	63
7	17	4	52	53,5
8	17	2	55	
9	18	3	63	61
10	18	2	59	
11	20	2	54	48,5
12	20	1	43	
	Hungernde Küchlein.			
1	1 Tag	2	59	46
2	1 „	3	33	
3	2 Tage	2	43	45
4	2 „	4	47	
5	3 „	3	48	56,5
6	3 „	3	65	
7	7 „	4	59	59
8	8 „	4	57	57

Wie man aus dieser Tabelle ersieht, ist das Niveau des Reststickstoffs im Blute ziemlich hoch, was wohl durch den energischen Transport des Eiweißstoffes aus dem Eiereiweiß und dem Dotter in den Embryokörper erklärt wird. Wahrnehmbare Veränderungen des Reststickstoffgehalts bemerkt man weder während der Inkubation noch nach dem Auskriechen aus dem Ei.

Literatur.

1) *Scheunert* und *Pelchrzim*, diese Zeitschr. **189**, 17, 1923. — 2) *Hasselbalch*, Skand. Arch. f. Physiol. **10**, 413, 1900. — 3) *Tangl*, Pflügers Arch. **93**, 327, 1902.

Über die Adsorptionsfähigkeit der Erythrocyten und die Diphtherie-immunität.

Von

M. P. Glusmann.

(Aus dem Bakteriologischen Institut in Charkow.)

(Eingegangen am 8. August 1926.)

Die Untersuchungsergebnisse der Adsorption von Eiweißspaltprodukten durch Erythrocyten gaben *Sbarsky* Veranlassung, eine neue Hypothese über den Zusammenhang zwischen dieser Adsorption und dem Mechanismus der Diphtherieimmunität aufzustellen[1]). Danach sind nur solche Tiere diphtherieempfänglich, deren Erythrocyten das Toxin adsorbieren und zu den empfindlichen Organen hin transportieren. Die empfänglichen Tiere werden immun, wenn ihre Erythrocyten unter dem Einfluß der Antikörper des Serums die Fähigkeit zur Adsorption des Diptherietoxins verlieren. *Sbarsky* stellt also die Anwesenheit von Antikörpern im aktiv immunisierten Organismus nicht in Abrede, schreibt diesen aber eine das Toxin neutralisierende Rolle nicht zu.

Diese Hypothese stützt sich hauptsächlich auf drei Beweisgründe:

1. Die Erythrocyten gegen Diphtherie verschieden empfindlicher Tiere zeigen einen ungleichen Adsorptionskoeffizienten, wobei als Adsorbat ein kompliziertes Gemisch von Eiweißabbauprodukten figuriert, unter denen sich auch das seiner chemischen Struktur nach uns unbekannte Diphtherietoxin befindet.

2. Das Diphtherietoxin wirkt weniger giftig, wenn die Adsorptionsoberfläche der Erythrocyten durch Hinzufügung anderer adsorbierbarer Stoffe zum Toxin (Chinin, Glykokoll, Alanin und Tyrosin) vermindert wird.

3. Die Erythrocyten gegen Diphtherie verschieden empfindlicher Tiere adsorbieren das Toxin verschieden stark.

---

[1]) Zeitschr. f. exper. Biol. u. Med. 1925, Nr. 1 u. 2 (russisch).

Am überzeugendsten als Beweis ist der dritte Befund, da hiernach das Diphtherietoxin auf dem bisher einzigen zuverlässigen Wege nachgewiesen werden kann, nämlich durch die Bestimmung seiner physiologischen Wirkung.

Die theoretische Bedeutung der von *Sbarsky* aufgestellten Hypothese zwingt uns, noch eine Reihe weiterer Beweisgründe zu ihrer Bestätigung zu fordern. Einer von diesen wäre z. B. die Bestätigung der Tatsache, daß die Erythrocyten von Tieren, die gegen Diphtherie künstlich immunisiert wurden, ihre Adsorptionsfähigkeit verlieren. Ist die Hypothese richtig, so müssen die Erythrocyten eines diphtherieempfindlichen, aber gegen das Diphtherietoxin resistent gewordenen Tieres die Fähigkeit zur Adsorption dieses Toxins verlieren, was übrigens ein Postulat a priori von *Sbarsky* ist. Da uns aktiv immunisierte Meerschweinchen zur Verfügung standen, die große Dosen von Diphtherietoxin ganz unbedenklich vertrugen, so entschlossen wir uns, die Untersuchung in dieser Richtung weiterzuführen.

Um eine tatsächlich vorhandene Adsorption feststellen zu können, muß man eine für den Adsorptionsprozeß typische Kurve erhalten. In unserem Falle läßt sich dies nicht erreichen, da man die Konzentration des Toxins in der Lösung und im Adsorbenten nicht genau feststellen kann, weil die Wirkung des Toxins von der Individualität der Versuchstiere abhängig ist. Außerdem ruft eine über eine gewisse Grenze hinausgehende beliebig große Dosis des Toxins den Tod des Tieres in einer und derselben Frist hervor. Auch die adsorbierende Oberfläche der Erythrocyten läßt sich infolge der ihnen eigenen Schwankungen nicht bestimmen.

Auf diese Weise können wir nur mit einem gewissen Grade von Wahrscheinlichkeit bestätigen, daß im vorliegenden Falle eine Adsorption stattfand; von einer Genauigkeit der Versuchsresultate ist keine Rede.

Wenn dessenungeachtet die Untersuchung der physiko-chemischen Erscheinungen im vorliegenden Falle erlaubt und sogar wünschenswert ist, so müssen neben einer allgemeinen Zusammenfassung die Versuche auch detailliert angeführt werden, damit durch die biologischen Einzelheiten die Unzulänglichkeit der physiko-chemischen Untersuchung erklärt wird.

Von diesen Erwägungen ausgehend, geben wir unsere Versuchsprotokolle in aller Ausführlichkeit wieder. Insbesondere sei bei der Durchsicht auf die Bedeutung der Infiltration und Nekrose hingewiesen. Die tägliche Erfahrung zeigt uns, daß die gleiche Toxindosis bei der einen Gruppe von Meerschweinchen den Tod hervorruft, bei einer anderen bloß Infiltration oder Infiltration mit nachfolgender Nekrose.

Dies ist besonders dann häufig der Fall, wenn — wie in unseren Versuchen — mit Grenzdosen gearbeitet werden muß.

Obgleich die Adsorption von Diphtherietoxin durch die Erythrocyten von Meerschweinchen bereits von *Sbarsky* festgestellt wurde, hielten wir es dennoch für zweckmäßig, diese Versuche ausschließlich für den Vergleich zwischen den Adsorptionskoeffizienten der Erythrocyten von normalen und immunisierten Meerschweinchen zu wiederholen.

Zu Beginn unserer Versuche benutzten wir Citratblut, wobei wir uns der anfangs von *Sbarsky* angewandten Methodik bedienten; später arbeiteten wir mit defibriniertem Blute, wie dies *Sbarsky* in seinen letzten Versuchen kategorisch fordert.

Protokolle der Versuche mit normalen Meerschweinchen.

Versuch 1. 20. Januar 1926. Vom Meerschweinchen Nr. 6 werden etwa 4 ccm Herzblut in einer 2proz. Natriumcitratlösung aufgefangen. Die roten Blutkörperchen werden dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zu den gewaschenen Erythrocyten werden 0,024 ccm Diphtherietoxin in 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung hinzugefügt, Toxin 677_1; D. L. M. = 0,009 bis 0,01 ccm. Das Gemisch wird auf 1½ Stunden in den Thermostaten (37,5°) gestellt. Die abzentrifugierten Erythrocyten und das Zentrifugat werden bis zum nächsten Tage im Eisschrank aufbewahrt.

21. Januar 1926. Das Zentrifugat wird dem Meerschweinchen Nr. 932 injiziert. Alle Erythrocyten werden dem Meerschweinchen Nr. 933 injiziert. Das erste Meerschweinchen geht in der Nacht vom 23. Januar zugrunde. Das zweite Tier bleibt am Leben, gibt jedoch ein Infiltrat mit nachfolgender ausgedehnter Nekrose.

Schlußfolgerung. Das Zentrifugat enthielt etwas mehr als die einfache tödliche Dosis des Diphtherietoxins. Die Erythrocyten adsorbierten etwas weniger als die tödliche Dosis.

Versuch 2. 25. Januar 1926. Vom Meerschweinchen Nr. 7 werden 4 ccm Blut in einer 2proz. Natriumcitratlösung aufgefangen. Zu den dreimal gewaschenen Erythrocyten werden 0,015 ccm des Toxins 677_1 in 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung hinzugefügt, das Gemisch wird auf 1 Stunde 20 Minuten in den Thermostaten (37,5°) gestellt. Die Injektion erfolgt unmittelbar nach dem Zentrifugieren.

Alle roten Blutkörperchen werden dem Meerschweinchen Nr. 939 (305 g) injiziert.

Das ganze Zentrifugat wird dem Meerschweinchen Nr. 938 (300 g) injiziert.

Beide Meerschweinchen reagierten mit Infiltraten, blieben aber am Leben.

Schlußfolgerung. Das Toxin ist zwischen Zentrifugat und Erythrocyten in einer Menge von weniger als der einfachen tödlichen Dosis verteilt.

Versuch 3. 28. Januar 1926. Vom Meerschweinchen Nr. 8 wird Blut in 2proz. Natriumcitratlösung aufgefangen. Zu den gewaschenen Erythrocyten werden in 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung 0,02 ccm Toxin 677_1 hinzugefügt. Erwärmung im Thermostaten 1 Stunde 20 Minuten.

Alle Erythrocyten werden dem Meerschweinchen Nr. 947 (270 g) injiziert.

Das ganze Zentrifugat wird dem Meerschweinchen Nr. 946 (290 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen bleibt am Leben, gibt aber ein großes Infiltrat.

Das zweite Tier ging am 30. Januar zugrunde.

Schlußfolgerung. Im Zentrifugat befand sich mehr als die einfache tödliche Dosis, die Erythrocyten adsorbierten etwas weniger.

Weiterhin wurden die Versuche nach der von *Sbarsky* angegebenen Methodik ausgeführt.

Versuch 4. 3. Februar 1926. Von den Meerschweinchen Nr. 8 und 9 werden ungefähr 8 ccm Blut in 1200 ccm physiologischer NaCl-Lösung genommen. Zu den dreimal gewaschenen Erythrocyten werden in 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung 0,02 ccm des Toxins 677_1 hinzugefügt. Verweilen im Thermostaten 1 Stunde; Zentrifugieren und Injektion.

Die Erythrocyten (3 ccm) werden dem Meerschweinchen Nr. 956 (330 g) injiziert.

Das Zentrifugat (1 ccm) wird dem Meerschweinchen Nr. 960 (365 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen ging in der Nacht zum 6. Februar ein.

Das zweite Meerschweinchen blieb am Leben, gab aber ein großes Infiltrat.

Schlußfolgerung. In der injizierten Menge des Zentrifugats war weniger als die einfache tödliche Dosis des Toxins vorhanden; in 3 ccm der Erythrocyten befand sich die einfache tödliche Dosis.

Versuch 5. 8. Februar 1926. Von den Meerschweinchen Nr. 10 und 11 wurden ungefähr 8 ccm Blut in 1200 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgefangen. Zu den gewaschenen Erythrocyten wurden 0,02 ccm Toxin 677_1 in 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung hinzugefügt, das Gemisch wurde 1 Stunde lang im Thermostaten gehalten.

3 ccm Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen Nr. 963 (260 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen Nr. 964 (215 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen ging in der Nacht zum 11. Februar ein.

Das zweite Meerschweinchen ging in der Nacht zum 12. Februar ein.

Schlußfolgerung. Im Zentrifugat und in den 3 ccm Erythrocyten war für das vorliegende Gewicht der Meerschweinchen je eine tödliche Dosis des Toxins vorhanden.

Aus den angeführten Versuchen geht mit aller Deutlichkeit die Tatsache der Adsorption von Diphtherietoxin durch die Erythrocyten nicht immuner Meerschweinchen hervor, übrigens durchaus in Übereinstimmung mit den Angaben von *Sbarsky*. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung hielten wir daher für überflüssig und gingen nunmehr zu den Versuchen der Adsorption des Diphtherietoxins durch die Erythrocyten aktiv immuner Meerschweinchen über.

Um eine Wiederholung zu vermeiden, möchten wir zuvor bemerken, daß in allen folgenden Versuchen mit Meerschweinchen das Blut von zwei immunen Tieren in einer Menge von 8 bis 9 ccm genommen und zu 1200 ccm

physiologischer NaCl-Lösung hinzugefügt wurde. Die Erythrocyten wurden dreimal zentrifugiert. Zu den gewaschenen Erythrocyten wurde die stets gleiche Toxinmenge von 0,02 ccm der Serie 677_1 oder der analogen Serie 677_2 mit der ebenfalls ständig gleichen Menge von 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung beigefügt. Das Gemisch wurde auf 1 Stunde in den Thermostaten bei 37,5° gebracht, darauf 15 bis 20 Minuten zentrifugiert, das Zentrifugat sorgfältig abgehoben und in einer Menge von 1 ccm einem normalen Meerschweinchen injiziert. Die Erythrocyten, die möglichst vom Boden genommen wurden, wurden in einer Menge von 3 ccm einem anderen Meerschweinchen injiziert.

Die Meerschweinchen, von denen die Erythrocyten genommen wurden, waren längere Zeit vorher durch ein Gemisch von T.-A. oder durch Anatoxin immunisiert worden und ertrugen ohne Beschwerde 20 D. L. M. des Diphtherietoxins. Lange nach der Blutentnahme vertrugen sie ganz anstandslos die gleiche Dosis. Diese Quantität wird von uns gewöhnlich zur Bestimmung der Unempfindlichkeit immunisierter Meerschweinchen angewendet, sie bringt aber den Grad der erreichten Immunität nicht zum Ausdruck. Wir injizierten gelegentlich mehr als 375 D. L. M. ebenso immunisierter Meerschweinchen, ohne daß in der Folge der Tod eintrat.

Versuch 6. 12. Februar 1926. Den immunen Meerschweinchen 841 und 846 wurde Blut entnommen und das Toxin 677_1 hinzugefügt.

3 ccm Erythrocyten wurde dem Meerschweinchen 976 (225 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen 977 (290 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen ging in der Nacht zum 16. Februar ein.

Das zweite Meerschweinchen blieb am Leben, gab aber ein großes in Nekrose übergehendes Infiltrat.

Schlußfolgerung. Die Erythrocyten adsorbierten die einfache tödliche Dosis. In 1 ccm des Zentrifugats fand sich weniger als die einfache tödliche Dosis.

Versuch 7. 16. Februar 1926. Das Blut wurde von den immunen Meerschweinchen Nr. 884 und 866 genommen. Hinzufügung von Toxin 677_1.

3 ccm Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen 978 (310 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen 979 (335 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen ging am 24. Februar ein.

Das zweite Meerschweinchen ging am 22. Februar ein.

Schlußfolgerung. In der injizierten Erythrocytendosis befand sich ungefähr so viel Toxin wie in der injizierten Dosis des Zentrifugats.

Versuch 8. 26. Februar 1926. Das Blut wurde von den Meerschweinchen Nr. 888 und 889 genommen; Hinzufügung von Toxin 677_1.

3 ccm der Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen Nr. 983 (320 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen Nr. 984 (330 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen ging in der Nacht zum 1. März ein.

Das zweite Meerschweinchen gab ein Infiltrat mit anschließender Nekrose.

Schlußfolgerung. In der injizierten Erythrocytenmenge befand sich die einfache tödliche Dosis; im injizierten Zentrifugat weniger als eine tödliche Dosis.

Versuch 9. 3. März 1926. Das Blut wurde von den immunisierten Meerschweinchen Nr. 887 und 889 genommen. Hinzufügung von Toxin 677_1.

3 ccm der Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen Nr. 1001 (400 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen Nr. 999 (345 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen gab ein Infiltrat mit anschließender ausgebreiteter Nekrose.

Das zweite Meerschweinchen ging am 9. März 1926 ein.

Schlußfolgerung. In der injizierten Erythrocytenmenge befand sich etwas weniger als die einfache tödliche Dosis für das gegebene Körpergewicht des Meerschweinchens; im injizierten Zentrifugat befand sich ungefähr die einfache tödliche Dosis.

Versuch 10. 19. März 1926. Das Blut wurde von den immunen Meerschweinchen Nr. 885 und 886 genommen. Hinzufügung von Toxin 677_1.

3 ccm der Erythrocyten wurden einem weißen Meerschweinchen (500 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde einem schwarzen Meerschweinchen (360 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen ging am 26. März zugrunde.

Das zweite Meerschweinchen gab ein großes Infiltrat, blieb aber am Leben.

Schlußfolgerung. In den Erythrocyten befand sich ungefähr die einfache tödliche Dosis, im Zentrifugat weniger als die einfache tödliche Dosis.

Versuch 11. 30. März 1926. Das Blut wurde von den immunen Meerschweinchen Nr. 951 und 952 genommen. Hinzufügung von Toxin 677_1.

3 ccm der Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen Nr. 1014 (280 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen Nr. 1015 (290 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen ging am 5. April, das zweite am 3. April zugrunde.

Schlußfolgerung. In den Erythrocyten und im Zentrifugat befand sich je eine tödliche Dosis für das gegebene Körpergewicht der Meerschweinchen.

Versuch 12. 12. April 1926. Das Blut wurde von den immunen Meerschweinchen Nr. 987 und 989 genommen. Hinzufügung von Toxin 677_1.

3 ccm der Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen Nr. 1019 (220 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen Nr. 1020 (220 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen ging am 18. April, das zweite am 19. April zugrunde.

Schlußfolgerung. In beiden Portionen befand sich ungefähr eine einfache, tödliche Dosis.

Versuch 13. 20. April 1926. Das Blut wurde von den immunen Meerschweinchen Nr. 901 und 902 genommen. Hinzufügung von Toxin 677_1.

3 ccm der Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen Nr. 1024 (250 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen Nr. 1025 (270 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen gab ein großes Infiltrat mit darauffolgender Nekrose.

Das zweite Meerschweinchen ging am 26. April ein.

Schlußfolgerung. In der injizierten Erythrocytenportion war etwas weniger als die einfache tödliche Dosis; im injizierten Zentrifugat befand sich ungefähr die einfache tödliche Dosis.

Wir beschlossen nun, die Versuche nicht weiter fortzusetzen, da sich ganz klar ergeben hatte, daß sich die Erythrocyten immuner Meerschweinchen hinsichtlich ihrer Adsorptionsfähigkeit in keiner Weise von denen normaler Meerschweinchen unterscheiden. Bei Anwendung toxischer Grenzdosen erwarteten wir keine besondere Genauigkeit der Resultate. Die in den Versuchen beobachteten Schwankungen lassen sich sehr gut durch die Individualität der Tiere sowie durch die ungenaue Graduierung der Pipetten, mit denen zu arbeiten wir gezwungen waren, erklären. Nimmt man eine allgemeine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse vor, so ergibt sich ein großer Unterschied gegenüber den Versuchen, die *Sbarsky* mit den Erythrocyten von Ratten angestellt hat. Dort riefen die Erythrocyten nach der Hinzufügung von Toxin kein einziges Mal den Tod von gegen Diphtherie empfindlichen Tieren herbei, was wir bei unseren Versuchen nicht beobachteten.

Analoge Resultate erhielten wir auch mit den Erythrocyten von Pferden, wie die folgenden Versuche zeigen.

Versuch 14. 12. Mai 1926. Das Blut wurde in einer Menge von 15 ccm von dem immunen Pferde Nr. 1373 genommen (in 1 ccm Serum 500 Immun-Einheiten[1]). Hinzufügung von Toxin 677_3.

3 ccm der Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen Nr. 1036 (250 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweicnhen Nr. 1037 (250 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen reagierte mit einem kleinen Infiltrat.

Das zweite Meerschweinchen gab keinerlei Reaktion.

Schlußfolgerung. An den Erythrocyten bleiben Spuren von Toxin haften. Aus dem Zentrifugat verschwand das Toxin vollständig.

Versuch 15. 29. Mai 1926. Das Blut wurde von einem normalen Pferde genommen. Hinzufügung von Toxin 677_3.

3 ccm der Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen Nr. 1044 (350 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen Nr. 1045 (300 g) injiziert.

Das erste Meerschweinchen ging am 1. Mai, das zweite am 27. Mai ein.

Schlußfolgerung. Sowohl die Erythrocyten, wie auch das Zentrifugat enthielten beispielsweise je eine tödliche Dosis.

---

[1]) Ich spreche an dieser Stelle dem Leiter der serologischen Abteilung, *Gregorowitsch*, für die erhaltenen Mitteilungen meinen Dank aus.

Versuch 16. 2. Juni 1926. Das Blut wurde vom immunen Pferde Nr. 1344 genommen (in 1 ccm Serum 1000 I.-E.). Hinzufügung von Toxin $6\frac{7}{2}$.

3 ccm der Erythrocyten wurden dem Meerschweinchen Nr. 1051 (300 g) injiziert.

1 ccm des Zentrifugats wurde dem Meerschweinchen Nr. 1050 (270 g) injiziert.

Das erste Tier gab ein nicht bedeutendes Infiltrat.

Das zweite Tier gab keinerlei Reaktion.

Das Resultat ist analog dem des Versuchs 14.

Aus technischen Gründen war es uns unmöglich, die Versuche mit den Erythrocyten von Pferden fortzusetzen, aus den angeführten Beispielen geht aber schon ganz deutlich hervor, daß im künstlich immunisierten Organismus nicht die Absorptionsfähigkeit der Erythrocyten, sondern die veränderten Eigenschaften des Serums das Tier vor der Vernichtung durch das Diphtherietoxin bewahren. Folgende Anaphylaxieversuche zeigen, daß das Toxin unter dem Einfluß nicht ausgewaschener Spuren von Serum verschwand.

Versuch vom 29. Mai 1926. Den Meerschweinchen Nr. 1036 und 1037 wurden intravenös je 0,4 ccm normalen Pferdeserums injiziert. Das Meerschweinchen Nr. 1037 ging nach 3 Minuten an anaphylaktischem Schock zugrunde; das Meerschweinchen Nr. 1036 zeigte anaphylaktischen Schock, blieb aber am Leben.

Versuch vom 20. Juni 1926. Dem Meerschweinchen Nr. 1050 wurden 0,4 ccm Serum intravenös injiziert; anaphylaktischer Schock und Tod nach 3 Minuten. Die Injektion von Serum bei dem Meerschweinchen Nr. 1051 mißlang.

Die Resultate der Anaphylaxieversuche bestätigen also vollkommen die Annahme, daß sich im Zentrifugat Serum befand und daß an den Erythrocyten nur sehr wenig Serum haften geblieben war.

In den Versuchen mit Meerschweinchenerythrocyten begegneten wir dieser Erscheinung nicht, da sich nach unserer Immunisierungsmethode im Blute nicht mehr als 10 Insulineinheiten von Antitoxin in 1 ccm befinden und ein dreimaliges Auswaschen der Erythrocyten augenscheinlich ausreicht, um das Antitoxin zu entfernen.

Somit bestätigen offenbar weder die Versuche mit den Erythrocyten von Meerschweinchen, noch die Versuche mit den Erythrocyten von Pferden die Hypothesen von *Sbarsky*, insoweit es sich um den Mechanismus erworbener Diphtherieimmunität handelt.

Um den Mechanismus der erworbenen Diphtherieimmunität zu erklären, ist die Aufstellung von Hypothesen über die Adsorption des Diphtherietoxins durch die Erythrocyten nicht notwendig. In Übereinstimmung mit den Tatsachen läßt sich heute in vollkommen befriedigender Weise dieser Mechanismus mit einer Neutralisation des Toxins durch das Serum erklären, ohne daß die Frage nach dem Wesen dieser Neutralisation berührt wird.

Zusammenfassung.

Sbarsky stellte die Hypothese von der Abhängigkeit der Diphtherieimmunität von der Adsorptionsfähigkeit der Erythrocyten auf. Versuche zeigten, daß die Erythrocyten von Meerschweinchen das Diphtherietoxin adsorbieren, die Erythrocyten von Ratten dagegen nicht. Die Aufgabe unserer Arbeit bestand darin, die Adsorptionsfähigkeit der Erythrocyten künstlich immunisierter Meerschweinchen und Pferde zu untersuchen. Der *Sbarsky*schen Hypothese entsprechend, sollte eine Adsorption in diesem Falle ausbleiben. Wir erhielten folgende Resultate:

1. In den Versuchen mit den Erythrocyten diphtherieempfindlicher Meerschweinchen wurde die Fähigkeit der Erythrocyten, das Diphtherietoxin zu adsorbieren, in vollkommener Übereinstimmung mit den Angaben von *Sbarsky* biologisch festgestellt.

2. In den Versuchen mit den Erythrocyten aktiv immunisierter Meerschweinchen wurde jedoch dieselbe Adsorptionsfähigkeit dem Diphtherietoxin gegenüber festgestellt.

3. Die Versuche mit den Erythrocyten von Pferden bestätigen wiederum die feststehende Tatsache, daß für einen aktiv immunisierten Organismus das Toxin infolge der Anwesenheit von Antitoxin unschädlich ist.

Untersuchungen über physiologische Gleichgewichtszustände bei Pflanzen. Verlauf der Trockensubstanzerzeugung und Stickstoffaufnahme bei Helianthus annuus L. unter verschiedener Höhe der Stickstoffversorgung.

Von

August Rippel und **Oskar Ludwig.**

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 9. August 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Da jede Erzeugung von Körpermasse eine Funktion der zugeführten Nährstoffe ist, so könnte man erwarten, daß, insbesondere bei einjährigen Pflanzen mit scharf umrissener einmaliger Wachstumsperiode, Verlauf der Trockensubstanzerzeugung und Verlauf der Nährstoffaufnahme einigermaßen parallel gingen. Bisherige Versuche hatten jedoch keine besondere Parallelität gezeigt, sondern ein zum Teil erhebliches Vorauseilen der Nährstoffaufnahme. Das sollte genauer, d. h. an längeren Versuchsreihen als man bisher benutzte, geprüft werden. Insbesondere sollte aber weiter festgestellt werden, ob die Änderung der Wachstumskonstanten bei verschieden hoher Nährstoffversorgung, wie sie von uns[1]) früher festgestellt wurde, auch für die Aufnahme der Nährstoffe gilt. Wir hatten ja gefunden, daß die Wachstumskonstante um so größer wird, je höher die Trockensubstanzerzeugung in ihrem Endwert wird. Gerade die Untersuchung dieser Verschiebungen im physiologischen Gleichgewichtszustand unter veränderten Bedingungen halten wir für die wesentlichste Aufgabe derartiger Untersuchungen.

Zu dem Versuch wurden die gleichen Zinkgefäße benutzt, wie zu dem früheren mit 19 kg Leinetalsand und je Gefäß 4 g K_2SO_4 und 6 g KH_2PO_4 beim Füllen. Ferner erhielt die eine Reihe 5 g NH_4NO_3 je Gefäß, die andere

[1]) Diese Zeitschr. **155**, 133, 1925.

den zehnten Teil = 0,5 g NH_4NO_3. Die erste ist im folgenden als „Viel"-, die zweite als „Wenig"-Reihe bezeichnet. Wasser wurde 70 Proz. der wasserfassenden Kraft (20,7 Proz.) gegeben. Mit fortschreitendem Wachstum wurde das entsprechende Frischgewicht an Wasser zugelegt. Versuchspflanze war Sonnenblume (Helianthus annuus L. uniflorus giganteus) von *Haage* und *Schmidt* (Erfurt). Eingesät wurden je Gefäß an je neun Stellen je drei Samen am 27. April 1925. Am 6. Mai wurden überall, wo drei Pflänzchen aufgegangen waren, eines herausgenommen (im ganzen 177 Keimlinge mit 3,42 g Trockensubstanz). Am 7. Mai wurde so weit vereinzelt, daß nur an je fünf Stellen zwei Pflänzchen stehenblieben. Am 9. Mai endgültige Vereinzelung auf je fünf Pflanzen je Gefäß, welche Zahl den Versuch über blieb. Bei jeder Periode wurden vier Gefäße geerntet.

Wie früher wurde nach Perioden geerntet, die durch die Entwicklung von Hafer gekennzeichnet waren: Von dem Erscheinen eben des zweiten bis zum Erscheinen eben des dritten Blattes. Die Perioden sind von der Einsaat aus gerechnet. Periode 14, 16, 18 wurden bei beiden Reihen, Periode 19 und 21 bei der Wenig-Reihe übersprungen, da die Entwicklung dieser Reihe sich länger hinauszog als diejenige der Viel-Reihe. Von sonstigen Vegetationsbeobachtungen sei nur mitgeteilt, daß am 18. Juli die erste Blüte in der Viel-, am 1. August die erste in der Wenig-Reihe sich zeigte, worin also auch diese Vegetationsverzögerung zum Ausdruck kommt.

Verlauf der Trockensubstanzbildung.

Tabelle I gibt zunächst die Trockensubstanzzahlen je Gefäß wieder, wobei die Mittelzahlen mit der wahrscheinlichen Schwankung angegeben sind, die, wie man sieht, bei der Viel-Reihe befriedigend, bei der Wenig-Reihe jeweils recht hoch ist, worauf noch zurückzukommen sein wird. Hierbei wurden auch die Wurzeln geerntet, aber für die je vier Parallelen zusammen gewogen, so daß hier keine Schwankungen angegeben werden können. Die Zahlen in Tabelle I sind natürlich je Gefäß ausgedrückt. Bei der Wurzelgewinnung verfuhren wir folgendermaßen: Zuerst wurde das zu erntende Gefäß über einem Sieb ausgestülpt, das eben den Sand durchließ, der durch Aufgießen von Wasser durchgespült wurde. Auf diese Weise gingen keine wesentlichen Wurzelteile verloren, wie sich zeigte. Die so gewonnene Menge wurde nochmals gründlich ausgespült zum Entfernen des Sandes, die Waschflüssigkeit wieder durchgesiebt zur Gewinnung losgerissener Wurzelteile. Von dieser Menge wurde der Trockensubstanzgehalt bestimmt; darauf wurde sie mit den Händen zerrieben und durch Ausblasen von gröberen Steinchen befreit, deren festgestelltes Gewicht in Abzug gebracht wurde. Die so gewonnene Substanz wurde gemahlen, der Sandgehalt durch Veraschen und Auswaschen mit heißem Wasser bestimmt und ebenfalls in Abzug gebracht. Dies Verfahren ist natürlich nicht völlig exakt, aber unter den gegebenen Verhältnissen wohl genügend. Eine Bestimmung des Sandes durch Bestimmen der Kieselsäure wäre nicht möglich gewesen wegen des Kalkgehalts des verwendeten Leinetalsandes. Das Auswaschen mit Wasser trennte wenigstens einen Teil

der Asche vom Sande. Im übrigen ist ja auch die Behandlung bei allen gleichmäßig. Aufschlämmen der Substanz in Chloroform und Sammeln der absitzenden Teile wäre jedenfalls auch nicht sicherer gewesen.

Tabelle I.

Trockensubstanz.

Periode	Reihe: Viel Stickstoff				Reihe: Wenig Stickstoff			
	Oberirdisch	Wurzeln	Gesamt	Wurzeln in Proz. d. Gesamtmenge	Oberirdisch	Wurzeln	Gesamt	Wurzeln in Proz. d. Gesamtmenge
3	0,46 ± 0,022	0,19	0,65	29,3	0,48 ± 0,023	0,19	0,67	28,3
4	1,57 ± 0,11	0,75	2,32	32,3	1,91 ± 0,12	0,75	2,66	28,2
5	4,9 ± 0,38	1,34	6,24	21,5	5,8 ± 0,35	1,73	7,53	23,0
6	9,6 ± 0,67	2,75	12,35	22,3	11,4 ± 0,34	4,28	15,68	27,3
7	22,4 ± 2,10	6,1	28,5	21,4	16,0 ± 2,00	6,1	22,1	27,6
8	37,6 ± 2,18	9,7	47,3	20,5	24,7 ± 1,02	9,1	33,8	26,9
9	64,1 ± 1,95	16,8	80,9	20,8	30,5 ± 2,29	9,6	40,1	23,9
10	97,8 ± 1,55	22,4	120,2	18,6	36,7 ± 1,27	10,0	46,7	21,4
11	125,9 ± 2,23	30,8	156,7	19,6	38,1 ± 1,83	11,9	50,0	23,8
12	164,9 ± 4,70	38,8	203,7	19,0	43,7 ± 2,26	13,3	57,0	23,3
13	196,2 ± 2,98	35,6	231,8	15,3	52,1 ± 2,44	14,0	66,1	21,2
14	Periode übersprungen				Periode übersprungen			
15	237,6 ± 7,16	39,6	277,2	14,3	56,5 ± 1,51	14,5	71,0	20,4
16	Periode übersprungen				Periode übersprungen			
17	263,4 ± 6,16	36,1	299,5	12,0	67,6 ± 3,34	14,3	81,9	17,5
18	Periode übersprungen				Periode übersprungen			
19	270,9 ± 7,37	38,0	308,0	12,3	„	„		
20	282,6 ± 1,28	40,8	323,4	12,6	70,6 ± 4,10	14,0	84,6	16,5
21					Periode übersprungen			
22					67,6 ± 1,95	12,4	80,0	15,5

Aus Tabelle I sei zunächst festgestellt, daß der relative Wurzelanteil mit fortschreitendem Alter sinkt. Ferner ist der relative Wurzelanteil bei der Wenig-Reihe höher als bei der Viel-Reihe, was bekannt ist. Man hat ja gefunden, daß bei geringer Nährstoffzufuhr die relative

Wurzelentwicklung höher ist[1]). Die ersten zwei bis drei Glieder sind hier allerdings auszunehmen, da nach Tabelle I kein wesentlicher Unterschied festzustellen ist. Wir werden jedoch sehen, daß gerade diese Anfangsglieder auch weitere Unregelmäßigkeiten zeigen.

Es soll nun die Anpassung an die *Robertson*sche Formel untersucht werden. Es ergibt sich dabei zunächst eine Bestätigung unserer früheren Feststellung, daß nämlich die Wachstumskonstante größer wird, wenn der absolute Endertrag größer ist, wie man am besten aus der Höhe der prozentigen Erträge (bezogen auf den Endwert) in den jeweiligen Perioden ersieht. Die Zahlen finden sich in Tabelle V, S. 331. Man beachte hierbei jedoch, daß unter „Wachstumskonstanten" diejenige Konstante verstanden ist, die sich ergibt, wenn auch die Endzeit gleich 100 gesetzt ist[2]). Da in beiden Reihen jedoch diese Endzeiten nicht gleich sind, so können die Relativzahlen der Tabelle V nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden. Nun liegt der Fall aber so, daß sich ja, wie oben gesagt, das Wachstum der Wenig-Reihe *länger* hinauszögerte als das der Viel-Reihe. Das läßt aber den Konstantenunterschied noch schärfer hervortreten: Denn der Unterschied könnte sich nur durch eine *verlängerte Vegetationsperiode der Viel-Reihe* ausgleichen, weil dann die ersten Perioden relativ tiefer lägen als gefunden, so daß somit die im Vergleich zur Wenig-Reihe relativ geringeren Erträge sich für relativ gleiche Zeiten erhöhen würden, somit also ein Ausgleich stattfände, was aber nicht der Fall ist, wie man sieht.

Das gilt für die oberirdische Trockensubstanz und die Gesamttrockensubstanz. Auch die Wurzeltrockensubstanz zeigt wohl das gleiche Bild, das aber nicht gut zu beurteilen ist, da hier der Zeitpunkt des Endertrags nicht sicher zu fassen ist. Bei der gewissen Unsicherheit der Bestimmung der Wurzeltrockensubstanz sei hierauf nicht weiter eingegangen.

Bei der Konstantenberechnung, die in Tabelle II wiedergegeben ist, zeigt sich dieser Unterschied sehr erheblich in der Größe der Wachstumskonstanten, die in der Wenig-Reihe 0,0371, in der Viel-Reihe 0,0550 beträgt. Es wurde hierbei wieder, wie früher, zur Vermeidung jeder Willkür als A der tatsächlich gefundene höchste Wert angenommen, wie die angegebenen Formeln zeigen. Die Konstanten der Wenig-Reihe stimmen nicht schön. Besonders fallen die beiden in Tabelle II umrahmten Werte aus den übrigen heraus. Sie wurden bei der Mittelbildung *nicht* berücksichtigt, was für die hier vertretene Anschauung

[1]) Z. B. *C. v. Seelhorst*, Journ. f. Landwirtsch. **46**, 52, 1898; *Burmester*, ebendaselbst **61**, 135, 1913.

[2]) *A. Rippel*, Wachstumsgesetze bei höheren und niederen Pflanzen, S. 21. Freising, F. P. Datterer, 1925 (S. 21).

(kleineres K bei geringerem Endwert) ungünstig ist, somit nicht als Beschönigung aufgefaßt werden kann. Es sei bemerkt, daß die gefundenen Werte offenbar zu niedrig waren. Die vier Parallelen ergaben in Periode 11 23,0, 39,1, 42,5, 47,7; in Periode 12 49,4, 46,5, 44,4, 34,4. Läßt man jeweils den niedrigsten Wert (23,0 bei 11 und 34,4 bei 12) weg, so ergibt sich als Mittel 43,1 bzw. 46,6 und die Konstanten lauten nunmehr 0,158 bzw. 0,132, passen also zu den übrigen. Doch ist von dieser Korrektur kein Gebrauch gemacht. Wie man sieht, treten die Unterschiede gleichwohl unzweifelhaft hervor.

Tabelle II.

Einzelkonstanten.

Periode	Konstanten der Viel-Reihe nach *Robertson*	Konstanten der Viel-Reihe nach *Baule*		Konstanten der Wenig-Reihe nach *Robertson*
3	0,332	4,54		0,320
4	0,305	4,61	4,54	0,270
5	0,274	4,47		0,220
6	0,270	4,67		0,190
7	0,243	4,36	4,50	0,192
8	0,240	4,46		0,152
9	0,223	4,20		0,154
10	0,199	3,73	4,16	0,150
11	0,244	4,55		0,056
12	0,240	4,50		0,095
13	0,221	4,08	4,04	0,139
14	—	—		—
15	0,200	3,55		0,115
16	—	—		—
17	0,203	3,39		0,187
18	—	—	3,38	—
19	0,179	3,37		—
20	A	A		A
Mittel:	0,241	4,18		0,190
Wachstumskonstante:	0,0550			0,0371
	$\frac{1}{x-11{,}39}\lg\frac{y}{282{,}6-y}=K$			$\frac{1}{x-9{,}77}\lg\frac{y}{70{,}6-y}=K$

Daß es sich bei diesem Konstantenunterschied nicht nur um eine Erscheinung der Endglieder, sondern auch um eine solche des mittleren Kurvenverlaufs handelt, geht daraus hervor, daß die prozentuale Maximalsteigerung der Viel-Reihe im höchsten Falle 14,6 (Periode 11 und 12), der Wenig-Reihe 10,7 (Periode 12 und 13) beträgt, wie es nach dem Konstantenunterschied theoretisch auch der Fall sein muß.

Wie man nun aus den Zahlen der Tabelle 1 ersieht, ist besonders die Wenig-Reihe mit beträchtlichen Schwankungen behaftet, die sich ja schon in dem kurz vorher besprochenen Falle bemerkbar machten. Wir werden sehen, daß solche Störungen bei der Stickstoffaufnahme

noch unangenehmer in Erscheinung treten. Was die Ursache davon ist, vermögen wir nicht zu sagen. Es wäre möglich, daß hier individuelle Schwankungen bei der geringen Zahl der Pflanzen (fünf je Gefäß) sich stark bemerkbar machen, besonders unter den ungünstigen Bedingungen der geringen Stickstoffversorgung. Es sei weiter bemerkt, daß sich unter den Gefäßen ab und zu eines befand, das sich als etwas leck erwies. Wenn auch die Pflanzen nicht bei voller Wasserkapazität gehalten wurden, so kam es doch hin und wieder vor, daß nach dem Gießen das Wasser offenbar heruntersackte und das Gefäß außen etwas feucht wurde. Wenn das auch, dem Augenschein nach, nicht erheblich sein konnte, so könnten doch auf diese Weise in dem einen oder anderen Gefäß geringe Stickstoffverluste aufgetreten sein, die zu anomalen Schwankungen führen konnten.

Jedenfalls zeigte die Wenig-Reihe schon äußerlich einen wenig ausgeglichenen Stand. Wir haben nun hier, wie bei dem vorigen Versuch, bei jeder Probe die vier zu erntenden Gefäße so ausgewählt, daß wir je einen schlechteren, einen besseren und zwei mittleren Standes ernteten. Die Einwände *Wagners*[1]) hierzu sind an anderer Stelle zurückgewiesen[2]). Auf jeden Fall können aber durch alle die erwähnten Umstände keine *systematischen* Fehler in den Versuch hineinkommen.

Mit diesen Schwankungen ist es auch zu erklären, daß die letzte Probe der Wenig-Reihe geringer ausfiel als die vorletzte. Für die Rechnung wurde, wie gesagt, um jede Willkür auszuschalten, der tatsächliche Höchstwert genommen. Man sieht auch, daß eine geringe Verschiebung keinen Einfluß auf das Ergebnis haben könnte.

Was nun aus Tabelle II noch besonders hervorzuheben ist, ist die schon früher beobachtete, also immer wiederkehrende Erscheinung, daß die Konstanten der ersten Glieder zu hoch ausfallen. Es sei darauf noch etwas näher eingegangen.

1. Die *Robertson*sche Kurve zeigt bei kleinem K eine Unstimmigkeit, die sich in diesem Sinne auswirken kann. Die notwendige Korrektur[3]) würde hier aber ziemlich gering sein, da K verhältnismäßig groß ist. Für den Höchstwert A würde sich, $K = 0{,}0550$ angenommen, 99,82 ergeben, so daß die Konstanten der beiden ersten Glieder (für die folgenden spielt die Korrektur keine Rolle mehr) ergeben würden

statt	0,332	0,305
korrigiert	0,318	0,300

woraus sich ergibt, daß die systematische Zunahme der Konstanten nach oben zwar etwas abgeschwächt wird, aber nicht verschwindet, was sich ja auch bei unseren früheren Versuchen ergab (Tabelle IV).

[1]) *H. Wagner*, Landw. Jahrb. **62**, 785, 1925.
[2]) *A. Rippel*, ebendaselbst **68**, 877, 1926.
[3]) *Derselbe*, Wachstumsgesetze, l. c., S. 23ff.

2. Wir hatten früher den Beginn des Wachstums vom Aufgang an gerechnet. Mit *Wagner* glauben wir, daß es richtiger ist, diesen mit dem Tage der Einsaat anzusetzen. Auf die Berechnung der Kurve nach *Robertson* hat das zunächst keinerlei Einfluß, da die Differenz $x - x_1$ die gleiche bleibt, wohl aber auf die Berechnung der auf Relativzeiten bezogenen Wachstumskonstanten. Bei Rechnen mit dem Tage des Aufgangs würde man statt 0,0550 0,0452 erhalten und statt 0,0371 0,0295.

3. Oben hatten wir schon festgestellt, daß der relative Wurzelanteil verschieden ist, mit zunehmendem Alter sinkt. Es ist danach klar, daß sich ein Ausgleich der Konstanten vollziehen müßte, wenn nunmehr anstatt nur der oberirdischen Trockensubstanz diese mitsamt den Wurzeln, die Gesamttrockensubstanz, berücksichtigt würde. Eine Ausrechnung zeigte jedoch, daß dieser Ausgleich so gering ist, daß er überhaupt nicht in Frage kommt.

4. Endlich sei noch auf die von *Baule* vorgeschlagene Form der Wachstumskurve eingegangen, für welche ebenfalls in Tabelle II, für die Viel-Reihe, die Konstanten berechnet sind. Man sieht, daß hier ebenfalls die Konstanten nach oben steigen, wie besonders deutlich wird, wenn man je drei Zahlen zusammenfaßt. Im übrigen dasselbe Bild: Die vier ersten Perioden zeigen wie bei den Robertsonkonstanten die vier höchsten Werte. Des weiteren verweisen wir auf die Ausführungen des einen von uns über die *Baule*sche und *Robertson*sche Kurve[1]).

Wir stellen hier fest, daß *beide* systematische Abweichungen in dem Gang der Konstanten zeigen, indem diese in beiden Fällen nach links[2]) ansteigen. Die ersten Glieder zeigen also niedrigeres Gewicht, als nach der Formel zu erwarten wäre. Wenn es sich hierbei um eine physiologisch bedingte Erscheinung handelt, so würde das bedeuten, daß zuerst das Wachstum langsamer ist, als dem späteren Wachstumsverlauf entspricht, also eine Wachstumshemmung vorhanden ist. Tatsächlich zeigen denn auch diese ersten Glieder noch weitere Unregelmäßigkeiten, wie wir bei Besprechung der Stickstoffaufnahme sehen werden. Auch sei nochmals auf die Bemerkungen oben über den relativen Wurzelanteil der ersten Glieder verwiesen.

Wir möchten es auch weiterhin nicht für unmöglich halten, daß sich auch noch andere Unregelmäßigkeiten herausstellen könnten,

---

[1]) *A. Rippel*, Landw. Jahrb. **63**, 877, 1926. Im Anschluß daran hat denn auch *Baule* (ebendaselbst **63**, 889, 1926) seine alte Formulierung des Wachstumsgesetzes aufgegeben und eine neue aufgestellt, auf die wir hier noch nicht eingehen, da uns zur Zeit der Abfassung *Baules* Arbeit erst im Fahnenabzug vorlag.

[2]) Die Konstanten sind dabei von links nach rechts geschrieben gedacht.

etwa in den *End*gliedern, was wir aber noch nicht beurteilen können, da wir diese noch zu wenig exakt erfassen können; die Schwierigkeiten sind hier zweifellos größer als bei den Anfangsgliedern. Wir stehen also in strengem Gegensatz zu *Wagner*, der die unbedingte Gültigkeit der *Baule*schen Formulierung voraussetzt und die gefundenen Zahlen gewissermaßen hineinzwängt. Wir betrachten im Gegenteil alle Formulierungen (auch die *Robertson*sche) einstweilen als empirische und glauben durch voraussetzungslosen Vergleich mit den experimentellen Befunden die Eigenschaften des Wachstumsablaufs richtiger erfassen zu können.

Auf einen weiteren Punkt sei noch aufmerksam gemacht: *Mitscherlich* hatte die Forderung gestellt, daß die Aussaat abgezogen werden sollte. Wir hatten jedoch darauf hingewiesen, daß nur so viel abgezogen werden dürfe als der Trockensubstanz etiolierter Pflanzen entspricht, da der Verlust durch Atmung usw. natürlich berücksichtigt werden muß. Die enthülsten Samen wogen bei vorliegendem Versuch lufttrocken 0,0225 g je Stück, etiolierte Pflänzchen von einer Haferperiode 0,0188 g (absolut trocken), vom Alter zweier Haferperioden 0,0182 g, so daß also für fünf Pflanzen je Gefäß noch 0,093 g in Abzug gebracht werden müßten. Man sieht, das würde die Unregelmäßigkeit der ersten Konstanten wieder etwas verstärken, indem sie noch etwas höher würden.

Verlauf der Stickstoffaufnahme.

Tabelle III zeigt den prozentigen Stickstoffgehalt in der Trockensubstanz; er nimmt, wie Kurve Abb. 1 für die beiden Reihen, oberirdische Trockensubstanz, zeigt, logarithmisch ab. Hierbei sind auf der Abszisse die Wachstumsperioden, auf der Ordinate die zugehörigen prozentigen Werte abgetragen. Diese Abhängigkeit gilt jedoch, wie man sieht, bei der Viel-Reihe erst von der vierten Probe (Periode 6) an. Vorher zeigen die Zahlen keine derartigen Beziehungen. In diesem Augenblick ist etwa ein Drittel der aufgenommenen Höchstmenge an Stickstoff bereits aufgenommen. Ähnliches zeigt die Wenig-Reihe (ebenfalls für die oberirdische Trockensubstanz, nur daß hier dieser Punkt früher, bei der zweiten Probe (Periode 4) liegt; auch hier bedeutet dieser Punkt ein Drittel der Höchstaufnahme an Stickstoff. Es scheint uns daraus mit aller Deutlichkeit hervorzugehen, daß diese Unregelmäßigkeit eine Begleiterscheinung der vorher schon erwähnten möglichen Wachstumshemmung in den ersten Kurvengliedern ist, wobei natürlich nicht ohne weiteres zu erkennen ist, ob und in welchem ursächlichen Zusammenhang beide Erscheinungen stehen, wenn uns das auch in folgender Weise der Fall zu sein scheint: Es wäre ja denkbar, daß die Aufnahme des Stickstoffs (wie natürlich auch der übrigen Nährstoffe) zunächst in den ersten Wachstumsstadien nicht entsprechend der

vorhandenen Menge vor sich gehen könnte, sondern erst nach einer gewissen Entwicklungsgröße und somit Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche; und auch deshalb nicht, weil die Anhäufung in der Pflanze nicht beliebig weit getrieben werden kann. Es würde damit in Einklang stehen, daß bei der Wenig-Reihe, wie oben gesagt und wie aus Tabelle III hervorgeht, der prozentige Gehalt schon erheblich früher regelmäßig wird als bei der Viel-Reihe. Es würde dann also die anfängliche Stickstoffaufnahme im Vergleich zur verfügbaren Menge zu gering sein und entsprechend auch die Trockensubstanzproduktion. Beide könnten sich erst von einem gewissen Entwicklungsstadium an angleichen, so daß also von diesem Gesichtspunkt aus eine anfängliche Wachstumshemmung erklärt werden könnte.

Tabelle III.

Prozentiger Stickstoffgehalt.

Periode	Reihe: Viel Stickstoff		Reihe: Wenig Stickstoff	
	Oberirdisch	Wurzeln	Oberirdisch	Wurzeln
3	4,612	4,526	4,428	3,773
4	5,211	5,037	4,970	4,604
5	5,132	4,025	3,886	2,795
6	5,206	3,271	1,796	1,450
7	3,459	3,175	1,100	1,126
8	2,264	2,194	0,872	1,116
9	1,626	1,567	0,681	0,807
10	1,259	1,395	0,609	0,788
11	0,949	1,115	0,560	0,691
12	0,757	0,975	0,500	0,700
13	0,706	0,884	0,490	0,689
14	—	—	—	—
15	0,598	0,771	0,415	0,721
16	—	—	—	—
17	0,592	0,657	0,379	0,717
18	—	—	—	—
19	0,572	0,635	—	—
20	0,508	0,624	0,358	0,662
21	—	—	—	—
22	—	—	0,414	0,635

Es könnte scheinen, als ob eine derartige Wachstumshemmung nicht besteht, wenn man nämlich für die ersten Glieder unserer Viel-Reihe, oberirdische Trockensubstanz, die Verdoppelungszeiten berechnet, also diejenige Zeit, ausgedrückt in unseren Perioden, innerhalb deren sich die Substanz verdoppelt. Man erhält so für die Perioden $^3/_4$, $^4/_5$, $^5/_6$ die Zahlen 0,41, 0,47, 1,04. Rechnet man nun mit den gefundenen Wachstumskonstanten 0,0550 und den entsprechenden x-Werten das zugehörige y aus, so erhält man statt der obigen Zahlen folgende (wobei mit den korrigierten y-Werten ge-

rechnet ist, sonst wären die Zahlen noch höher): 1,13, 1,32, 1,30. Wir hätten also keine Wachstumshemmung in unseren empirischen Zahlen, sondern eine Förderung. Das wäre aber ein voreiliger Schluß, denn die Verdoppelungszeiten erniedrigen sich ja nach den jüngeren Perioden zu. Wir können also zu gleichen Zeiten empirisch eine frühere Periode finden, als dem Theoretischem entspricht, womit sich die Verdoppelungszeit natürlich entsprechend erniedrigen muß, was in Wirklichkeit eben doch die Folge einer Wachstumshemmung sein kann. Hier sind natürlich weitere Versuche sehr erwünscht. Es mag aber noch erwähnt sein, daß auch bei dem Wachstum von Bakterien eine solche anfängliche Wachstumshemmung festgestellt wurde, worüber auf die Arbeiten von *Rahn*[1]) und *Meller*[2]) verwiesen sei.

Auch die Wurzeln verhalten sich prinzipiell ähnlich, nur daß die anfängliche Unregelmäßigkeit hier in beiden Reihen auf die erste Probe (Periode 3) beschränkt ist. Daß sie aber auch hier bei der Viel-Reihe größer ist als bei der Wenig-Reihe, sieht man aus den Zahlen der Tabelle III; es sinkt nämlich der prozentige Gehalt an N in der Viel-Reihe von Periode 4 zu 5 nur um $^1/_5$, bei der Wenig-Reihe dagegen um fast $^1/_2$.

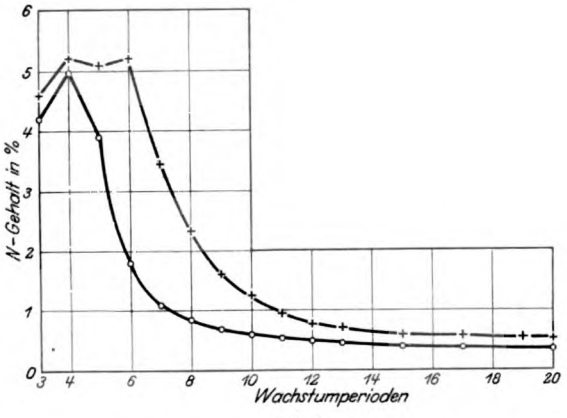


Abb. 1.
○ Wenig-Reihe. + Viel-Reihe.

Wir wenden uns nunmehr wieder zur Betrachtung der ganzen Kurven in Abb. 1 und 2. Abb. 1 zeigt zunächst den prozentigen N-Gehalt als Funktion der einzelnen Wachstumsperioden für die beiden Reihen. Es scheint unzweifelhaft, daß beide Kurven in ihrer Krümmungsintensität verschieden sind, und zwar die Wenig-Kurve steiler abfällt

[1]) *O. Rahn*, Centralbl. f. Bakteriol., Abh. II, **16**, 426 und 614, 1906.
[2]) *R. Meller*, ebendaselbst **64**, 1, 1925.

als die Viel-Kurve. Abb. 2 zeigt die gleichen prozentigen Zahlen als Funktion der zugehörigen Trockensubstanzzahlen (Relativzahlen). Hierdurch müssen sich natürlich beide Kurven etwas einander nähern. Aber es ist augenscheinlich, daß die Wesensverschiedenheit der beiden Kurven noch etwas bestehen bleibt. Es würde das also besagen, daß während des Wachstumsablaufs bei der geringen Stickstoffversorgung

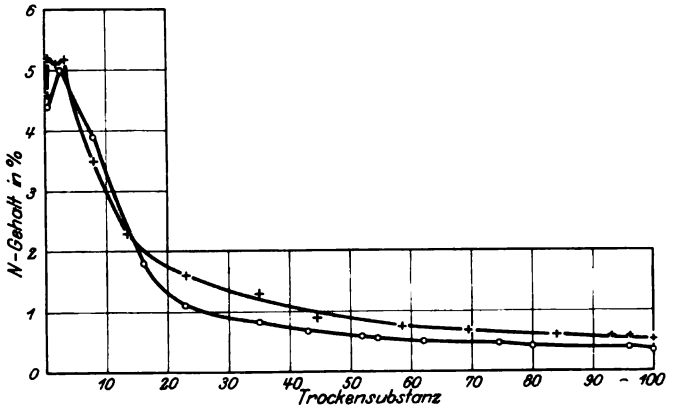


Abb. 2.
○ Wenig-Reihe. + Viel-Reihe.

dieselbe Konzentration an Stickstoff in der Pflanze mehr Trockensubstanz erzeugt als bei hoher Stickstoffversorgung; das stimmt aber völlig überein mit den Vorstellungen, die der eine von uns über die Abhängigkeit der Substanzerzeugung von der Konzentration der zugeführten Nährstoffe entwickelt hat: Die Wirkungskonstante eines variablen Nährstoffs ist um so größer, je geringer die Versorgung mit den übrigen Nährstoffen ist[1]). Beide Fälle sind selbstverständlich nicht gleich, beruhen aber offenbar auf der gleichen Ursache.

Was nun die in Tabelle IV wiedergegebenen Zahlen der absoluten Stickstoffaufnahme betrifft, so zeigt sich eben die schon von *Liebscher*[2]) festgestellte Erscheinung, daß keine unmittelbaren Beziehungen zwischen Trockensubstanzerzeugung und Nährstoffaufnahme bestehen, sondern diese jener stark vorauseilt. Man vergleiche auch die soeben erschienene Arbeit von *Schleusener*[3]). Wenn andererseits *Pfeiffer* und *Rippel*[4]) gefunden haben, daß bei ihren Versuchen die Nährstoffaufnahme der Trockensubstanzproduktion nicht so vorausläuft, wie das die älteren Versuche zeigten, so geht aus den vorliegenden Versuchen

[1]) *A. Rippel*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Dg. (A) **7**, 1, 1926.
[2]) *G. Liebscher*, Journ. f. Landw. **35**, 335, 1887.
[3]) *W. Schleusener*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Dg. (A) **7**, 137, 1926.
[4]) *Th. Pfeiffer* und *A. Rippel*, Journ. f. Landwirtsch. **69**, 137, 1921.

Tabelle IV. Absolute Stickstoffaufnahme.

Periode	Reihe: Viel Stickstoff			Reihe: Wenig Stickstoff			
	Oberirdisch	Wurzeln	Gesamt	Oberirdisch	Wurzeln	Gesamt	
3	0,021	0,009	0,030	0,022	0,007	0,029	
4	0,082	0,038	0,120	0,094	0,035	0,129	
5	0,251	0,054	0,305	0,215	0,048	0,273	0,270
6	0,500	0,088	0,588	0,205	0,062	0,267	
7	0,775	0,194	0,969	0,176	0,069	0,245	0,281
8	0,851	0,213	1,064	0,215	0,102	0,317	
9	1,042	0,263	1,305	0,208	0,077	0,285	0,294
10	1,231	0,312	1,543	0,224	0,079	0,303	
11	1,195	0,343	1,538	0,213	0,082	0,295	0,304
12	1,248	0,378	1,626	0,219	0,093	0,312	
13	1,385	0,315	1,700	0,255	0,096	0,351	
14	—	—	—	—	—	—	0,345
15	1,421	0,305	1,726	0,234	0,105	0,339	
16	—	—	—	—	—	—	
17	1,559	0,237	1,796	0,256	0,103	0,359	
18	—	—	—	—	—	—	0,353
19	1,550	0,241	1,791	—	—	—	
20	1,436	0,255	1,691	0,253	0,093	0,346	
21	—	—	—	—	—	—	
22	—	—	—	0,280	0,079	0,359	

Gewicht der Samen (lufttrocken) . . . . 0,113 g je 5 Stück
Stickstoffgehalt der Samen . . . . . 0,0052 g „ 5 „
„ „ etiolierten Pflanzen . . 0,0051 g „ 5 „
Periode 1
Stickstoffgehalt der etiolierten Pflanzen . . 0,0053 g je 5 Stück
Periode 2

hervor, daß die äußeren Bedingungen hierbei eine wesentliche Rolle spielen. Im vorliegenden Falle sind z. B. bei der Viel-Reihe in Periode 10 86 Proz. des Stickstoffs aufgenommen, aber erst 37,2 Proz. des Endertrags erreicht. Bei der Wenig-Reihe sind sogar schon in Periode 5 76 Proz. des Stickstoffs aufgenommen und erst 8,9 Proz. des Endertrags der Trockensubstanz erreicht. Man ersieht das am besten aus Tabelle V, in der die Relativzahlen aller Werte zusammengestellt sind.

Wie man sieht, machen sich in der Wenig-Reihe die Schwankungen sehr stark bemerkbar: Während die Trockensubstanzerzeugung immer eine stetige Zunahme zeigt, springen die Stickstoffzahlen etwas hin und her. Das ist natürlich eine Folge der fast beendeten Stickstoffaufnahme in Verbindung mit den größeren Schwankungen der Einzelproben. Wenn, wie es hier der Fall war, die Proben zeitlich sehr dicht aufeinander folgen, kann es leicht zu solchen Unregelmäßigkeiten kommen. Faßt man, wie es auch in der Tabelle IV geschehen ist, je zwei aufeinander folgende Zahlen zusammen, was etwa dem Überspringen je einer Periode gleichkäme, so verschwinden, wie es zu erwarten ist, diese Unregelmäßigkeiten.

Wie sehr die Stickstoffaufnahme der Trockensubstanzerzeugung vorausläuft, ersieht man am besten aus Abb. 3, in der die Trockensubstanz (Gesamtmenge) als Funktion der aufgenommenen Stickstoffmenge dargestellt ist.

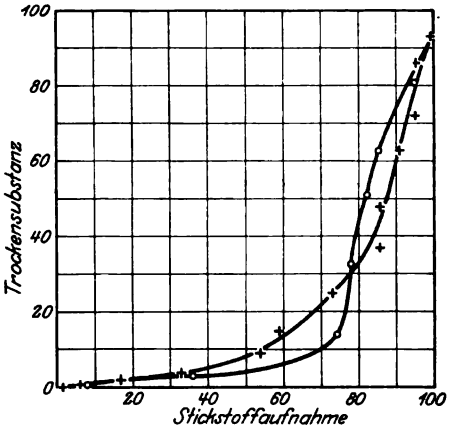


Abb. 3.
○ Wenig-Reihe. + Viel-Reihe.

Eine wichtige Frage ist nun die: Geht die Trockensubstanzerzeugung, wenn nicht der Entwicklung der ganzen Pflanze, wenigstens der Entwicklung eines Teiles der Pflanze parallel? Wenn man diese Möglichkeit in Betracht zieht, so ist es am wahrscheinlichsten, anzunehmen, daß sie der Entwicklung derjenigen Organe parallel geht, in denen auch die Verarbeitung des Stickstoffs stattfindet, nämlich der Blätter. Leider haben wir diesen Gesichtspunkt nicht frühzeitig genug in Betracht gezogen, so daß wir ihn experimentell noch nicht prüfen konnten; es ist das für das nächste Jahr beabsichtigt. Aber diese Annahme ist die wahrscheinlichste: Wir wissen, daß die älteren Blätter bereits absterben, wenn die ganze Pflanze sonst noch im kräftigsten Wachstum steht; aus ihnen wandert dann der in den Chloroplasten zu Eiweiß verarbeitete Stickstoff zum größten Teile [etwa 75 Proz.[1])] aus und wird offenbar zum Aufbau von Stengeln, Früchten usw. verwandt, besonders auch der letzteren. Die Blattentwicklung ist dann aber abgeschlossen. Im vorliegenden Falle begann die Viel-Reihe am 18. Juli (in Periode 13), die Wenig-Reihe am 1. August (in Periode 15) zu blühen. Aus Tabelle V ersieht man, daß die Stickstoffaufnahme in diesem Zeitpunkt denn auch so gut wie abgeschlossen ist. Man

[1]) *A. Rippel*, Biol. Centralbl. **41**, 508, 1921.

kann also mit größter Wahrscheinlichkeit annehmen, daß Blattentwicklung und Stickstoffaufnahme einander wenigstens einigermaßen parallel gehen.

Tabelle V.

Relativzahlen.

Periode	Oberirdisch				Wurzeln				Gesamt			
	viel Stickstoff		wenig Stickst.		viel Stickstoff		wenig Stickst.		viel Stickstoff		wenig Stickst.	
	Tr.-S.	N	Tr.-S.	N	Tr.-S.	N	Tr.-S.	N	Tr.-S.	N	Tr.-S.	N
3	0,2	1,4	0,7	7,9	0,5	2,4	1,4	6,7	0,2	1,7	0,8	8,1
4	0,5	5,3	2,7	33,6	1,8	10,1	5,4	33,3	0,7	6,8	3,1	35,9
5	1,7	16,1	8,2	76,9	3,2	14,3	12,4	45,7	1,9	17,0	8,9	76,0
6	3,4	32,1	16,1	73,2	6,8	23,3	30,6	59,0	3,8	32,8	18,5	74,3
7	7,9	49,7	22,6	62,9	15,0	51,3	43,6	65,7	8,8	54,0	26,1	68,2
8	13,3	54,6	35,0	76,9	23,8	56,4	65,0	97,1	14,6	59,2	40,0	88,3
9	22,7	66,8	43,2	74,3	41,2	69,3	68,6	73,3	25,0	72,6	47,4	79,4
10	34,6	78,9	52,0	80,0	54,9	82,6	71,4	75,2	37,2	85,9	55,2	84,4
11	44,5	76,7	54,0	76,1	75,5	90,8	85,0	78,1	48,4	85,6	59,1	82,2
12	58,4	80,5	61,9	78,2	95,1	100	95,0	88,6	63,0	90,6	67,4	86,9
13	69,4	88,8	73,8	91,1	87,2		100	91,4	71,7	94,6	78,1	97,8
14	—	—	—	—	—			—	—	—	—	—
15	84,0	91,1	80,0	83,6	97,1			100	85,7	96,1	83,9	94,4
16	—	—	—	—	—				—	—	—	—
17	93,2	100	95,8	91,4	88,5				92,6	100	96,8	100
18	—	—	—	—	—				—	—	—	—
19	95,9		—	—	93,1				95,2		—	
20	100		100	90,4	100				100		100	
21				—								
22				100								

Hierbei ist jedoch noch auf eines hinzuweisen: Aus Tabelle IV und V geht hervor, daß in den späteren Vegetationsstadien die Stickstoffaufnahme möglicherweise noch langsam fortschreitet, falls es sich nicht (s. weiter unten) um Versuchsfehler handelt. Danach ist es sehr wohl möglich, daß die Stickstoffaufnahme der Blattentwicklung zwar zum größten Teile parallel ginge aber nicht durchaus. Das könnte dann seinen Grund darin haben, daß auch von Stengel und Früchten Stickstoff unmittelbar aufgenommen wird oder, was mit ziemlicher Sicherheit anzunehmen ist, daß die Blätter ja auch nach beendeter Entwicklung, solange sie noch nicht vergilbt sind, noch weiter Stickstoff aufnehmen werden. Denn wir wissen, daß nachts eine Abwanderung verarbeiteten Stickstoffs aus den Blättern vor sich geht, so daß tagsüber mit einer entsprechenden Wiederauffüllung zu rechnen ist[1]).

Mit diesen Überlegungen soll gezeigt werden, daß auch zwischen Blattentwicklung und Stickstoffaufnahme wahrscheinlich keine völlige

[1]) *K. Mothes*, Planta **1**, 472, 1926.

Parallelität zu erwarten sein dürfte. Doch wäre die Feststellung dieser Beziehung sehr wichtig.

Vergleichen wir nun weiter die Stickstoffaufnahme beider Reihen miteinander, wozu die relativen Zahlen der Trockensubstanzproduktion und Stickstoffaufnahme in Tabelle V zusammengestellt sind, so geht daraus hervor, wenn wir zunächst die Gesamtzahlen betrachten, daß bei der Wenig-Reihe, ebenso wie die relative Trockensubstanzproduktion zu entsprechenden Zeiten höher ist als bei der Viel-Reihe, dies auch für die Stickstoffaufnahme gilt, und zwar ist das Verhältnis in Periode 3 bis 5 fast dasselbe, nämlich etwa: relative Trockensubstanz/relativer Stickstoffaufnahme = 1/10. Von Periode 6 bis 13 dagegen ist dieses Verhältnis bei der Viel-Reihe merklich weiter als bei der Wenig-Reihe, z. B. in Periode 6 bei Viel 1/8,6 gegen 1/4,0 bei Wenig. Bei den letzten Perioden verwischt sich diese naturgemäß. Daß die drei ersten Perioden sich in beiden Reihen ebenfalls nicht unterscheiden, ist der schon erwähnten Unregelmäßigkeit der Stickstoffaufnahme in diesen Perioden zuzuschreiben. Es geht also daraus hervor, daß die relative Trockensubstanzzunahme, bezogen auf die relative Stickstoffaufnahme, bei der Wenig-Reihe größer ist als bei der Viel-Reihe, d. h. die relative Stickstoffwirkung ist in der Wenig-Reihe größer. Es ging das ja auch schon aus der Betrachtung der prozentigen Stickstoffzahlen oben hervor. Die Stickstoffaufnahme läuft der Trockensubstanzproduktion also *relativ*[1]) bei der Viel-Reihe mehr voraus als bei der Wenig-Reihe; *absolut*[1]) würde man dagegen sagen können, daß umgekehrt die N-Aufnahme der Wenig-Reihe der Trockensubstanzerzeugung sehr viel mehr vorausläuft als bei der Viel-Reihe, wenn man von den Prozentzahlen der Höchstmengen ausgeht. Es wäre sehr wünschenswert, dies künftighin schärfer auseinanderzuhalten. Unsere Zahlen stehen im Gegensatz zu der Angabe von *Schleusener* (l. c.), wonach die N-Aufnahme bei N-Zufuhr der Trockensubstanzproduktion stärker vorausliefe als ohne oder mit geringer N-Zufuhr (in unserem obigen absoluten Sinne). Doch handelt es sich bei diesem um Feldversuche, die wenig über das Prinzipielle aussagen können. Auch zeigt die Tabelle S. 154 manche Ausnahme davon.

Betrachten wir nun weiter die Verhältnisse bei den Wurzeln und der oberirdischen Substanz, so ist das Bild prinzipiell das gleiche. Als auffallend sei aus Tabelle V erwähnt, daß die relative Stickstoffaufnahme der Wurzeln in beiden Reihen bis etwa Periode 11 nahezu gleich verläuft mit der der oberirdischen Substanz, während die relative

[1]) Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei ausdrücklich bemerkt, daß *relativ* und *absolut hier*, an dieser Stelle, auf die prozentigen Zahlen der Tabelle V angewendet sind.

Trockensubstanz der Wurzeln der der oberirdischen Substanz erheblich vorausläuft. Absolut tritt schließlich in den Wurzeln eine Stickstoffabnahme ein, die offenbar auf Abwanderung von Stickstoff in die oberirdischen Teile beruht. Sie tritt bei der Viel-Reihe bereits bei Periode 13, bei der Wenig-Reihe erst bei Periode 17 in Erscheinung. Wenn auch die Sicherheit dieser Zahlen nicht bekannt ist, so dürfte doch so viel daraus hervorgehen, daß bei reichlicher Stickstoffversorgung absolut und relativ mehr Stickstoff aus den Wurzeln für die oberirdischen Teile mobilisiert werden kann, was durchaus verständlich ist. Die absolute Mobilisation würde, wenn die Maximalzahl und die Minimalzahl angenommen werden, betragen bei der Viel-Reihe 0,141, bei der Wenig-Reihe 0,026 g; die relative Mobilisation derselben Zahlen 37,3 bzw. 24,8 Proz.

Bemerkungen zur Ertragskurve.

Es sei noch eine Bemerkung über die Ertragskurve angeschlossen. Unsere frühere Feststellung, daß die Ertragskonstante, der *Mitscherlich*sche Wirkungsfaktor, sich mit der Zeit ändert, und zwar mit zunehmendem Alter kleiner wird, zeigt sich hier vollauf bestätigt, wie das Verhältnis der Erträge der Viel- und Wenig-Reihe in den verschiedenen Wachstumsperioden zeigt. Es ist diese Tatsache inzwischen auch von *Baule*[1]) anerkannt worden. Dabei muß noch darauf hingewiesen werden, daß die ersten vier Perioden der Viel-Reihe nach Tabelle I sogar gegenüber der Wenig-Reihe bereits auf dem absteigenden Ast der Ertragskurve liegen; wenn die Unterschiede auch noch innerhalb der Fehlergrenzen liegen, so kann es doch kein Zufall sein, daß es in den vier ersten Perioden nacheinander zu beobachten ist. Es war das auch äußerlich so auffallend, daß wir fast an eine Verwechslung der beiden Reihen dachten, bis sich von der fünften Probe an die eigentlichen Unterschiede zeigten. Wegen dieser Frage sei auf eine weitere Veröffentlichung des einen von uns verwiesen[2]). Ein gleiches wurde auch von *R. Meyer*[3]) für Aspergillus festgestellt, allerdings in ausgeprägterem Maße.

Zusammenfassung.

Es wird der Wachstumsverlauf und der Verlauf der Stickstoffaufnahme bei Helianthus annuus untersucht bei geringer und bei reichlicher Stickstoffversorgung, wobei auch die Wurzeln geerntet wurden. Es bestätigt sich, daß die Wachstumskonstante mit geringerer Stickstoffversorgung sinkt, es steigt also die relative Trockensubstanzproduktion in der ersten Hälfte der Wachstumskurve. Entsprechend steigt auch die relative Stickstoffaufnahme, wenn man diese Relativwerte als absolute Zahlen betrachtet. Bezieht man sie dagegen auf

[1]) *B. Baule*, Landw. Jahrb. **63**, 889, 1926.

[2]) Im Erscheinen: *A. Rippel*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Dg. (A) 7, 1926.

[3]) Erscheint an gleicher Stelle wie [2]).

die zugehörige relative Trockensubstanz, so bleibt diese verhältnismäßige Stickstoffaufnahme bei der Wenig-Reihe hinter derjenigen der Viel-Reihe zurück. In den ersten Gliedern der Wachstumskurve finden sich Unregelmäßigkeiten (zu hohe Konstanten bzw. zu niedrige empirische Werte), die, in Hinsicht auf die Robertsonkurve, vorläufig als Wachstumshemmung definiert werden. In diesen Gliedern finden sich ferner Unregelmäßigkeiten im prozentigen Stickstoffgehalt; beide stehen vielleicht in ursächlichem Zusammenhang. Die Berücksichtigung der Wurzeln ändert das sich aus der oberirdischen Trockensubstanz ergebende Bild nicht, obwohl der relative Wurzelanteil von den ersten Wachstumsstadien an stetig sinkt, also ein Ausgleich der erwähnten Unregelmäßigkeiten eintreten müßte, der aber so gering ist, daß er überhaupt nicht merkbar wird.

Der spezifische Brechungszuwachs des Gesamteiweißes im Blutserum.

Von

Gottfried Schretter.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Innsbruck.)

(Eingegangen am 9. August 1926.)

Die Frage des spezifischen Brechungszuwachses des Serumeiweißes als Ganzes und die damit eng verknüpfte Frage des spezifischen Brechungszuwachses der beiden Hauptfraktionen des Serumeiweißes hat sowohl ein chemisches, allgemeinbiologisches als auch ein methodisches Interesse für die Eiweißanalyse des Blutserums.

Unter spezifischem Brechungszuwachs wird der Brechungswert einer 1proz. Lösung nach Abzug des Brechungswertes des Lösungsmittels bei der üblichen Temperatur für Messungen mit dem *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometer (17,5°) verstanden. Der spezifische Brechungszuwachs ist bekanntlich ein summarischer Ausdruck der Art, Zahl und Bindung der Atome, also der chemischen Struktur. Würden bei verschiedenen Personen oder zu verschiedenen Zeiten bei derselben Person für die Globuline und Albumine Schwankungen desselben nachgewiesen werden, so wäre damit ein Beweis gewonnen, daß die Globulin- und die Albuminfraktion bei verschiedenen Individuen oder am gleichen Individuum zu verschiedenen Zeiten nicht die gleiche physikalische oder chemische Struktur haben, man könnte also bei positivem Versuchsausfall einen Beitrag zu der Frage gewinnen, *ob zwischen normalem und pathologischem Serumeiweiß nicht nur Unterschiede in der Aussalzbarkeit, sondern auch qualitativ chemische Unterschiede bestehen.*

Außerdem hat die Frage ein methodisches Interesse insofern, als sie eine der Grundlagen der refraktometrischen Mikroeiweißanalysen nach *Reiss* und nach *Robertson* berührt, arbeitet doch gerade die Methode von *Robertson* mit einem konstanten spezifischen Brechungszuwachs für Albumin und für Globulin, die Methode von *Reiss* sogar mit einem konstanten spezifischen Brechungszuwachs für das Gesamteiweiß.

Daß die Voraussetzung einer ziemlichen Konstanz des spezifischen Brechungszuwachses für die Fraktionen des Serumeiweißes mit hinreichender Annäherung zutrifft, wird durch die Übereinstimmung wahrscheinlich gemacht, welche die $MgSO_4$-Fraktionierung und Kjeldahlbestimmung nach *Berger* und *Petschacher*, oder die Na_2SO_4-Fraktionierung und Kjeldahlbestimmung nach *Arnd* und *Hafner* und schließlich die Am_2SO_4-Fraktionierung und N-Bestimmung nach *Kjeldahl* nach Auswaschen des Am_2SO_4-Stickstoffs nach einer neuen Methode von *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* mit der refraktometrischen *Robertson*schen Methode ergeben haben. Demgegenüber erklärten *Starlinger* und *Hartl* auf Grund von Wägungen an der Torsionswage, die jedoch inzwischen von *Arnd* und *Hafner*, sowie von *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* als nicht ganz zuverlässig kritisiert wurden, daß der spezifische Brechungszuwachs von Albumin und Globulin unter pathologischen Verhältnissen viel größeren Schwankungen unterliege, als die bisherigen Untersucher angegeben haben, und daß somit unter den von *Berger* und *Petschacher* diskutierten Fehlerquellen der refraktometrischen Methode nach *Robertson* besonders die letzte, nämlich die Variabilität des spezifischen Brechungszuwachses von Albumin und Globulin, ein solches Ausmaß erreiche, daß dadurch die Anwendbarkeit der Mikroeiweißanalyse nach *Robertson* in Frage gestellt wird.

Die folgenden Untersuchungen bringen einen Beitrag zu der durch die Angaben von *Starlinger* und *Hartl* neuerlich zur Diskussion gestellten und bisher gewiß noch nicht genügend untersuchten Frage nach der Variabilität des spezifischen Brechungszuwachses der Eiweißkörper des Blutserums unter pathologischen Bedingungen.

In einer ersten Mitteilung sollen die Bestimmungen des spezifischen Brechungszuwachses des Gesamteiweißes zusammengestellt werden.

Eiweißgehalt und Eiweißzusammensetzung in den untersuchten Seren.

Wenn Abweichungen des spezifischen Brechungszuwachses für das Gesamteiweiß, Albumin und Globulin gegenüber den bisher als mehr oder weniger konstant angenommenen Werten vorkommen, so sind solche, wie *Starlinger* und *Hartl* ganz richtig betonen, am ehesten in *pathologischen* Sera zu erwarten. Es wurden deshalb der vorliegenden Untersuchung Seren zugrunde gelegt, die als pathologisch dadurch gekennzeichnet sind, daß sie:

1. Von kranken Menschen stammen (siehe klinische Diagnose).

2. Die für pathologisch verändertes Serum charakteristische Vermehrung des Reststickstoffs und ein pathologisches Verhalten der Viskosität, die nach dem Verfahren von *Petschacher* durch die spezifische Viskositätserhöhung (η) charakterisiert wurde, zeigten.

Stärkere pathologische Vermehrung oder Verminderung des Gesamteiweißspiegels oder Hyperglobulinämie war in den untersuchten Seren nicht nachweisbar.

Untersucht wurden neun pathologische Menschensera, welche von Patienten unserer Klinik stammen. Alle Sera sind Nüchternsera,

Tabelle I.

Eiweißgehalt und Eiweißzusammensetzung in den untersuchten Seren.

Nr.	Name	Klinische Diagnose	Beschaffenheit des Serums	Nach *Robertson*				Nach *Petschacher, Berger, Schretter*				Rest-N	η	(η) nach *Robertson*	(η) nach *Petschacher, Berger, Schretter*
				Gesamteiweis g-Proz.	Globulin g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz.	Gesamteiweis g-Proz.	Globulin g-Proz.	Albumin g-Proz.	Globulin g-Proz.	mg-Proz.			
3	*Pedron II*	Cor. descomp. Hypertonie	nicht hämolyt., Trypanrot-färb.	7,20	2,04	5,16	21	6,55	2,09	4,46	31	55	1,71	0,095	0,105
4	*Moos*	Herzinsuf. bei Flimmerarythmie	nicht hämolyt., ikterisch	6,97	2,03	4,94	29	6,76	2,05	4,71	30	66	1,67	0,093	0,096
5	*Schwarz*	Urämie	nicht hämolyt., klar.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	*Trapp*	Schrumpfniere, Urämie Hypertonie	nicht hämolyt., etwas lypämisch	7,10	2,54	4,56	36	7,08	2,93	4,15	41	244	1,92	0,126	0,127
7	*Bader*	Croup. Pneunonie	nicht hämolyt.	6,86	2,63	4,23	39	6,48	1,68	4,79	26	46	—	—	—
8	*Kreidl I*	Chron. Nephr. Hypertonie. Ödeme	nicht hämolyt.	5,87	1,58	4,29	27	5,61	1,84	3,74	32	55	1,81	0,134	0,140
9	*Walch*	Myodeg. Arteriosklerose. Nephritis	nicht hämolyt.	7,54	2,97	4,57	39	7,44	2,98	4,46	40	77	1,93	0,120	0,122
10	*Pedron III*	= 3	nicht hämolyt., geringe Trypanrot-färbg., subikter.	7,56	1,77	5,79	24	7,21	2,39	4,82	33	36	1,74	0,095	0,099
11	*Peer Ascites*	Magen-Ca. periton. Metast. Ascites	—	3,42	1,58	1,84	46	3,51	2,09	1,42	60	55	1,68	0,193	0,188
12	*Kreidl II*	= 8	nicht hämolyt.	5,87	1,58	4,29	27	5,45	1,67	3,78	30	70	1,81	0,134	0,144

wodurch Fehlern durch erhöhten Lipoidgehalt aus dem Wege gegangen wurde. Außerdem wurde eine sterile Ascitesflüssigkeit untersucht, die mir größere Ausgangsmengen und die Möglichkeit einer Paralleluntersuchung bot.

Methoden, welche zur Charakterisierung der Eiweißverhältnisse herangezogen wurden, sind:

1. Die refraktometrische Mikroeiweißanalyse nach *Robertson* in Modifikationen nach *Berger* und *Petschacher*.

2. Die kjeldahlometrische Eiweißanalyse mit Ammonsulfatfraktionierung und Auswaschen des Ammonsulfatstickstoffs durch Umfällen mit Natriumwolframat und Schwefelsäure nach *Petschacher*, *Berger* und *Schretter*.

3. Die Bestimmung der spezifischen Viskositätserhöhung nach *Petschacher*.

Die Ergebnisse der Serumanalysen sind in Tabelle I zusammengestellt.

Der spezifische Brechungszuwachs des Gesamteiweißes.

Mit dem spezifischen Brechungszuwachs des Gesamteiweißes im Serum haben sich unter anderen *Reiss*, *Robertson*, *Rohrer*, *Arnd* und *Hafner*, *Starlinger* und *Hartl*, *Neuhausen* und *Rioch*, *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* beschäftigt.

Der spezifische Brechungszuwachs wird prinzipiell dadurch bestimmt, daß man an der zu untersuchenden Lösung einerseits den *auf Eiweiß entfallenden Brechungsanteil*, andererseits den *Eiweißgehalt* auf kjeldahlometrischem oder gravimetrischem Wege ermittelt. Der *Quotient* aus dem auf erstem durch den auf zweitem Wege ermittelten Wert ergibt den *spezifischen Brechungszuwachs*, d. h. den Brechungsanteil für 1 Proz. Eiweiß. Auf dieser Grundlage wurden von verschiedenen Autoren nun Methoden angewandt, die sich durch verschiedene Darstellung und Definition des Eiweißanteils unterscheiden, weshalb die Resultate nicht unmittelbar vergleichbar sind.

A. Gravimetrische Eiweißbestimmung.

1. Der Brechungswert des *dialysierten* und *alkoholfällbaren* Serumanteils. Erstes Verfahren nach *Reiss*. Serum wurde gegen Brunnen- und destilliertes Wasser 4 bis 6 Wochen lang bis zur Kochsalzfreiheit dialysiert. Das durch *ausgefallenes Euglobulin* leicht getrübte Dialysat wurde *filtriert* und der Brechungskoeffizient bestimmt. Der Gesamteiweißgehalt wurde durch *Alkoholfällung*, einstündiges Erhitzen, Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther, Trocknung bis zur Gewichtskonstanz bei 105 bis 110°, Wägung, Veraschung und Abzug der Asche bestimmt.

2. Der Brechungswert des *dialysierten* und *hitzekoagulablen* Serumanteils. Zweites Verfahren nach *Reiss*. In durch Dialyse stark verdünntem Serum wurde das bei der *Dialyse ausgefallene Eiweiß* durch Zusatz von Natriumcarbonat von genau bekanntem Brechungskoeffizient wieder *gelöst*. In dieser Lösung wurde der Brechungskoeffizient bestimmt. Nun

wurde die Lösung durch *Essigsäurehitzefällung* im zugeschmolzenen Röhrchen enteiweißt und wieder der Brechungskoeffizient bestimmt. Die Differenz der Brechungskoeffizienten vor und nach der Enteiweißung ergibt den Brechungskoeffizienten des Eiweißanteils. Der Gesamt-N wurde wie bei 1. ermittelt.

3. Der Brechungswert des *adialysablen* Serumanteils. Verfahren nach *Rohrer*. Zur Messung des Brechungsanteils der Nichteiweißkörper beschränkt sich *Rohrer* auf die Bestimmung der *dialysablen* Stoffe. Fette und Lipoide (etwa 0,3 g-Proz.), Albumosen, adialysable anorganische Stoffe, die nach *Rona* und *Takahashi* nur wenige Milligrammprozent ausmachen, werden bei diesem Verfahren sowohl bei der Refraktionsbestimmung als auch bei der Gewichtsbestimmung als Eiweiß gerechnet, ein Fehler, den *Rohrer* bewußt mit in Kauf nimmt. Das Serum wurde gegen eine etwa 1,1proz. NaCl-Lösung von der Refraktion 20,2 zum Dialysierausgleich gebracht. Die Konzentration und der prozentuale Brechungsanteil der Nichteiweißkörper in der Innen- und der Außenflüssigkeit wurden als gleich angenommen. Die Bestimmung des Gehalts an festen Stoffen in der Innen- und Außenflüssigkeit durch Trocknen und Wägen gibt dann durch Subtraktion der beiden Werte den Gehalt der Innenflüssigkeit an nichtdialysablen Stoffen. Der Quotient aus Brechungsanteil und Gewicht der nichtdialysablen Stoffe ergibt den Brechungszuwachs für 1 Proz.

Hier sind, wie bereits betont, bei der Refraktionsbestimmung und bei der Gewichtsbestimmung auch die adialysablen Nichteiweißkörper als Eiweiß gerechnet und außerdem jener Teil der dialysablen Serumstoffe, die bei dieser Versuchsanordnung in der Innen- und Außenflüssigkeit ungleich verteilt sind (*Donnan*sches Gleichgewicht).

4. Der Brechungsanteil des *hitzekoagulablen* Serumanteils. Verfahren nach *Starlinger* und *Hartl*. Der Gesamteiweißgehalt wird durch Säure-Hitzefällung, Filtrieren, Auswaschen bis zur negativen Bariumsulfatreaktion, einmaliges Waschen mit kaltem Alkohol und Äther, Trocknung und Wägung an der Torsionswage bestimmt.

Hier sind, wie bei allen folgenden angeführten Untersuchern, für die Refraktionsbestimmung die hitzekoagulablen oder vom Koagulum mitgerissenen Nichteiweißkörper als Eiweiß gerechnet.

B. Bestimmung des Gesamteiweißgehalts auf kjeldahlometrischem Wege.

1. Der Brechungswert der in Alkali gelösten *Alkoholfällung* nach Trocknen und Wiederauflösen. Verfahren nach *Robertson* (zitiert nach *Reiss*). *Robertson* hat Ochsenseren zur Refraktionsmessung gebracht; das Gesamteiweiß durch Alkoholfällung, Reinigung, Trocknung, Lösung unter Alkalizusatz in verschiedenen Verdünnungen dargestellt und den Eiweißgehalt im allgemeinen nach *Kjeldahl* bestimmt.

2. Der Brechungswert des *nicht ultrafiltrierbaren* Serumanteils. *Neuhausen* und *Rioch* bestimmten den Eiweißgehalt ebenfalls nach *Kjeldahl*. Zur Bestimmung der Eiweißrefraktion benutzten sie jedoch die Methode der Ultrafiltration, während die übrigen angeführten Autoren nach der Methode von *Robertson* so verfahren, daß die Restrefraktion durch Hitzekoagulation bestimmt wird und diese, sowie die Refraktion des Wassers von der Vollserumrefraktion in Abzug gebracht wird (mit Ausnahme von *Reiss* und *Rohrer*). *Neuhausen* und *Rioch* setzten die Refraktion des Ultrafiltrats der Refraktion der Nichteiweißkörper gleich und gingen sonst auf analoge Weise vor.

3. Der Brechungswert des *hitzekoagulablen* Serumanteils. Verfahren nach *Arnd* und *Hafner*. Der Eiweißbrechungswert wird nach *Robertson* durch Subtraktion: Vollserumrefraktion — Refraktion des nichthitzekoagulabeln Serumanteils berechnet. Der Eiweißgehalt wird durch N-Bestimmung nach *Kjeldahl* und Multiplikation mit dem Faktor 6,25 nach Abzug des Reststickstoffs ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde an den Seren (bzw. der Ascitesflüssigkeit), an denen weiterhin (siehe die folgende Mitteilung) der spezifische Brechungszuwachs für Albumin und für Globulin auf direktem Wege nach Isolierung und auf indirektem Wege bestimmt wurde, auch der spezifische Brechungszuwachs für das nichtisolierte und möglichst unbeeinflußte Gesamteiweiß nach dem von *Arnd* und *Hafner* angewendeten Verfahren bestimmt.

Der Eiweißgehalt ist in dieser Reihe aus dem N-Gehalt berechnet. Die Berechnung hat zur Voraussetzung, daß der Quotient aus Eiweißgewicht : Eiweißstickstoff (Kjeldahlfaktor) auch bei pathologischen Seren keinen größeren Schwankungen ausgesetzt ist.

Die Werte bringt Tabelle II.

Tabelle II.

Spezifischer Brechungszuwachs des *Gesamteiweißes*.

Nr.	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert
3	6,55	0,002 11 ± 0,000 02*)	+ 0,000 09
4	6,56	0,001 98 ± 0,000 01	— 0,000 04
6	7,08	0,001 96 ± 0,000 03	— 0,000 06
7	6,48	0,002 09 ± 6,000 02	+ 0,000 07
8	5,61	0,002 00 ± 0,000 04	— 0,000 02
9	7,44	0,002 00 ± 0,000 01	— 0,000 02
10	7,21	0,001 98 ± 0,000 03	— 0,000 04
11	3,51	0,001 96 ± 0,000 06	— 0,000 06
12	5,43	0,002 07 ± 0,000 02	+ 0,000 05

*) Fehlerbreite, berechnet aus Doppelbestimmungen.

Maximalwert	0,00211
Mittelwert	*0,00202*
Minimalwert	0,00196
Maximale Abweichung vom Mittelwert	± $0,00007_5$
Mittlere Abweichung vom Mittelwert	± 0,00005
Mittlere Fehlerbreite berech. aus Doppelbestimmungen	± $0,00002_5$

Um die Unterlagen für die Beurteilung des spezifischen Brechungszuwachses zu erweitern, wurde auch aus den von *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* untersuchten 32 pathologischen Menschen- und 7 normalen Kaninchenseren, sowie aus einer Untersuchungsreihe von *Berger* und

Galehr (47 pathologische Menschen- und 23 pathologische Kaninchensera) der spezifische Brechungszuwachs für das Gesamteiweiß berechnet und in Tabelle III, IV, V, VI geordnet.

Die Variation des spezifischen Brechungszuwachses ist in jeder Tabelle übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle III.

Spezifischer Brechungszuwachs des *Gesamteiweißes.*

Berechnet aus 32 pathologischen Menschenseren (aus *Petschacher, Berger* und *Schretter*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **50**, 449, 1926).

Nr.	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert	Nr.	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert
6	6,87	0,002 00	+ 0,000 03	23	5,85	0,001 93	— 0,000 04
7	7,26	0,002 04	+ 0,000 07	24	8,34	0,001 93	— 0,000 04
8	7,35	0,002 00	+ 0,000 03	25	7,44	0,001 95	— 0,000 02
9	7,35	0,001 96	— 0,000 01	26	8,38	0,001 99	+ 0,000 02
10	7,02	0,002 04	+ 0,000 07	27	7,30	0,002 04	+ 0,000 07
11	6,85	0,002 09	+ 0,000 12	28	6,98	0,001 92	— 0,000 05
13	7,83	0,001 94	— 0,000 03	29	6,58	0,001 83	— 0,000 14
14	7,98	0,001 95	— 0,000 02	30	5,60	0,002 00	+ 0,000 03
15	7,00	0,001 91	— 0,000 06	31	6,68	0,001 87	— 0,000 10
16	7,35	0,002 01	+ 0,000 04	32	5,93	0,001 92	— 0,000 05
17	5,56	0,002 00	+ 0,000 03	33	8,77	0,001 86	— 0,000 11
18	6,32	0,001 83	— 0,000 14	34	6,17	0,001 98	+ 0,000 01
19	9,14	0,001 91	— 0,000 06	43	6,80	0,002 04	+ 0,000 07
20	6,65	0,001 93	— 0,000 04	44	6,69	0,001 97	0
21	6,65	0,002 15	+ 0,000 18	45	7,72	0,002 02	+ 0,000 05
22	8,14	0,001 91	— 0,000 06	46	9,05	0,002 05	+ 0,000 08

Maximalwert	0,002 15
Mittelwert	*0,00197*
Minimalwert	0,001 83
Maximale Abweichung vom Mittelwert	± 0,000 16
Mittlere Abweichung vom Mittelwert	± 0,000 06

Tabelle IV.

Spezifischer Brechungszuwachs des *Gesamteiweißes.*

Berechnet aus 47 pathologischen Menschenseren aus der Versuchsreihe von *Berger* und *Galehr.*

Name	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert	Name	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert
Bre.	7,94	0,001 94	— 0,000 07	*Gur.*	7,88	0,001 95	— 0,000 06
„	7,98	0,002 03	+ 0,000 02	„	7,29	0,001 92	— 0,000 09
„	7,69	0,001 90	— 0,000 11	*Hoj*	9,15	0,001 91	— 0,000 10
Nej.	7,47	0,001 89	— 0,000 12	„	7,11	0,002 02	+ 0,000 01
„	6,01	0,001 98	— 0,000 03	*Döb.*	6,73	0,002 15	+ 0,000 14
Fis.	9,06	0,001 89	— 0,000 12	„	6,52	0,002 16	+ 0,000 15
„	7,60	0,001 89	— 0,000 12	„	5,89	0,002 06	+ 0,000 05

Tabelle IV (Fortsetzung).

Name	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert	Name	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert
Döb.	6,97	0,002 06	+ 0,000 05	*Hof.*	7,32	0,002 06	+ 0,000 05
„	7,38	9,001 96	— 0,000 05	*Roi.*	6,62	0,002 09	+ 0,000 08
Sch.	8,16	0,002 02	+ 0,000 01	„	8,81	0,001 95	— 0,000 06
„	5,70	0,002 09	+ 0,000 08	„	7,29	0,002 09	+ 0,000 08
„	6,34	0,002 11	+ 0,000 10	*Laz.*	6,45	0,001 99	— 0,000 02
„	6,35	0,002 28	+ 0,000 27	„	6,18	0,001 95	— 0,000 06
Tan.	6,06	0,002 08	+ 0,000 07	„	6,53	0,002 04	+ 0,000 03
„	5,62	0,002 12	+ 0,000 11	*May.*	8,52	0,002 08	+ 0,000 07
„	5,99	0,002 12	+ 0,000 11	„	6,77	0,002 02	+ 0,000 01
Tief.	7,04	0,001 99	— 0,000 02	„	7,69	0,002 03	+ 0,000 02
Tief.	6,69	0,001 97	— 0,000 04	*Pal.*	7,19	0,001 98	— 0,000 03
„	6,64	0,001 99	— 0,000 02	„	8,63	0,002 04	+ 0,000 03
Bad.	7,01	0,001 79	— 0,000 22	*Hit.*	8,10	0,002 14	+ 0,000 13
„	8,04	0,001 96	— 0,000 05	*Jord.*	7,98	0,001 94	— 0,000 07
„	8,52	0,001 89	— 0,000 12	*Haa.*	7,04	0,002 08	+ 0,000 07
Hof.	7,16	0,001 99	— 0,000 02	*Rog.*	8,03	0,002 06	+ 0,000 05
„	6,77	0,002 07	+ 0,000 06				

Maximalwert	0,00228
Mittelwert	*0,00201*
Minimalwert	0,00179
Maximale Abweichung vom Mittelwert	± 0,00024
Mittlere Abweichung vom Mittelwert	± 0,00007

Tabelle V.

Spezifischer Brechungszuwachs des *Gesamteiweißes.*

Berechnet aus sieben normalen Kaninchenseren (aus *Petschacher, Berger* und *Schretter*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **50**, 449, 1926).

Nr.	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert	Nr.	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert
36	6,58	0,001 86	— 0,000 03	40	6,65	0,001 88	— 0,000 01
37	6,52	0,001 94	+ 0,000 05	41	6,54	0,001 86	— 0,000 03
38	6,89	0,002 01	+ 0,000 12	42	6,28	0,001 84	— 0,000 05
39	6,52	0,001 85	— 0,000 04				

Maximalwert	0,00201
Mittelwert	*0,00189*
Minimalwert	0,00184
Maximale Abweichung vom Mittelwert	± 0,000085
Mittlere Abweichung vom Mittelwert	± 0,00005

Zu Tabelle V. Bei den Normalseren von *Kaninchen* zeigt sich, daß fünf Sera fast vollständige Übereinstimmung des spezifischen Brechungszuwachses für das gesamte Serumeiweiß aufweisen, während bei zweien relativ starke Abweichungen auftreten. Irgendwelche Besonderheiten der beiden aus der Reihe fallenden Kaninchensera waren nicht zu ermitteln. Die Minimalwerte der Kaninchensera stimmen mit denen der menschlichen Sera überein, der Maximalwert der normalen Kaninchensera ist niedriger als der Maximalwert der pathologischen Menschensera.

Tabelle VI.

Spezifischer Brechungszuwachs des *Gesamteiweißes.*

Berechnet aus 23 pathologischen Kaninchenseren aus der Versuchsreihe von *Berger* und *Galehr.*

Nr.	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert	Nr.	Eiweiß g-Proz.	Spezifischer Brechungszuwachs	Differenz vom Mittelwert
1	6,64	0,002 06	+ 0,000 07	4	6,69	0,002 01	+ 0,000 02
	6,27	0,002 00	+ 0,000 01		6,22	0,002 02	+ 0,000 03
	6,42	0,001 91	— 0,000 08	5	6,54	0,002 03	+ 0,000 04
	6,82	0,001 96	— 0,000 03		6,77	0,002 02	+ 0,000 03
2	6,20	0,002 14	+ 0,000 15	7	6,37	0,002 12	+ 0,000 13
	6,51	0,002 00	+ 0,000 01		5,95	0,002 01	+ 0,000 02
	7,22	0,001 92	— 0,000 07		6,20	0,002 16	+ 0,000 17
3	6,74	0,001 89	— 0,000 10	8	7,82	0,002 00	+ 0,000 01
	6,30	0,001 97	— 0,000 02		6,58	0,002 12	+ 0,000 13
	6,34	0,001 87	— 0,000 12		6,34	0,001 76	— 0,000 23
	6,56	0,001 96	— 0,000 03		6,45	0,001 87	— 0,000 12
4	6,68	0,001 97	— 0,000 02				

Maximalwert	0,002 16
Mittelwert	*0,001 99*
Minimalwert	0,001 76
Maximale Abweichung vom Mittelwert	± 0,000 20
Mittlere Abweichung vom Mittelwert	± 0,000 07

Zur Erklärung der Schwankungen des spezifischen Brechungszuwachses sind hauptsächlich drei Möglichkeiten heranzuziehen:

1. Einflüsse der *Methodik* der Refraktionsbestimmung und der quantitativen kjeldahlometrischen Eiweißbestimmung sowie der Darstellung der untersuchten Proteine.

2. Existenz eines einheitlichen spezifischen Brechungszuwachses für Albumin und eines *einheitlichen, aber von dem des Albumins verschiedenen Brechungszuwachses für Globulin,* wie das schon *Reiss* angegeben und *Robertson* besonders hervorgehoben hat. In diesem Falle müßte der spezifische Brechungszuwachs des Gesamteiweißes im Serum vom Albumin-Globulinverhältnis abhängen. Der spezifische Brechungszuwachs des Gesamteiweißes müßte um so größer sein, je höher der Globulingehalt ist, falls es zutrifft, daß der spezifische Brechungszuwachs für Globulin größer ist als für Albumin.

Die Durchsicht der Tabellen II, III, IV, V, VI und der hier nicht angeführten aber ebenfalls bestimmten Globulinrelation ergibt jedoch *keinen Anhaltspunkt für eine gesetzmäßige Abhängigkeit des spezifischen Brechungszuwachses für das Gesamteiweiß vom relativen Globulingehalt* in den untersuchten Seren, ebensowenig, wie eine Abhängigkeit vom *Gesamteiweißgehalt.*

3. *Variationen des spezifischen Brechungszuwachses für Albumin bzw. Globulin* in verschiedenen Seren, die durch Veränderungen der Unterfraktionen, z. B. des Euglobulin-Pseudoglobulinverhältnisses, oder durch sonstige Änderungen der Eiweißzusammensetzung innerhalb der Fraktionen bedingt sein könnten.

Die erste Möglichkeit soll hier besprochen werden, auf Besprechung der zweiten und dritten Möglichkeit kann erst nach Erhalt der Werte für isoliertes Albumin und Globulin eingegangen werden.

Die methodische Fehlerbreite bei der Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses des Gesamteiweißes.

Methodisch ergeben sich Fehler aus der *Robertson*schen Methodik (Refraktionsbestimmung) und der Kjeldahlmethode (Gewichtsbestimmung).

Das Maximum der möglichen Fehler erhält man, wenn man bei Doppelbestimmungen bzw. Mehrfachbestimmungen der Eiweißrefraktion und des Eiweiß-(N-)Gehalts erhaltenen Grenzwerte in der folgenden Weise kombiniert:

$\frac{\text{R max.}}{\text{E min.}}$ wird die größte +-Abweichung ergeben,

$\frac{\text{R min.}}{\text{R max.}}$ dagegen die größte —-Abweichung.

Für die Refraktionsbestimmung ist nach den Angaben von *Berger* und *Petschacher* für die Restrefraktion (a) und die Vollserumrefraktion (b) ein Ablesefehler von je 0,1 Skalenteilen, entsprechend einer n_D-Abweichung von $\pm$ 0,00002, in Summe also eine Abweichung von $\pm$ 0,00006 ($2a + b$) anzunehmen. Bei der Kleinheit des bei dieser Bestimmung zu erwartenden Fehlers wurde hier auf Doppelbestimmungen verzichtet und für die Fehlerberechnung obige Werte berücksichtigt.

Für die Kjeldahlbestimmung ergeben sich die Abweichungen aus den bei jeder Serumprobe vorliegenden Doppelbestimmungen für den Gesamt- und den Reststickstoff.

Man erhält also auf diese Weise folgende $\pm$-Abweichungen, welche auf die *Fehlerbreite der beiden angewendeten Methoden* zurückzuführen sind (in der Reihenfolge der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sera): $\pm$ 0,00002, $\pm$ 0,00001, $\pm$ 0,00003, $\pm$ 0,00002, $\pm$ 0,00004, $\pm$ 0,00001, $\pm$ 0,00003, $\pm$ 0,00006, $\pm$ 0,00002. Der Fehler erreichte im Mittel also $\pm$ 0,00003, als Maximalwert $\pm$ 0,00006, als Minimalwert $\pm$ 0,00001.

Unterschiede des spezifischen Brechungszuwachses des Gesamteiweißes in verschiedenen Seren können also rein methodisch bedingt sein, wenn sie $\pm$ 0,00003 im allgemeinen nicht überschreiten.

Wird diese Betrachtung auf die in den Tabellen III, IV (pathologische Menschensera) und Tabellen V, VI (normale und pathologische Kaninchensera) angeführten Sera aus Versuchsreihen von *Petschacher, Berger* und *Schretter*, sowie von *Berger* und *Galehr* und aus den eigenen Versuchsreihen angewendet, so zeigt sich, daß *die bei 118 Seren gefundenen Unterschiede über die rein methodisch erklärbare Schwankungsbreite nicht weit hinausgehen.*

Aus den genannten Untersuchungsreihen ergaben sich folgende Werte:

	Schretter (9 Menschen)	*Petschacher, Berger* und *Schretter* (32 Menschen)	*Berger* und *Galehr* (47 Menschen)	*Petschacher, Berger* und *Schretter* (7 Kaninchen)	*Berger* und *Galehr* (23 Kaninchen)
Mittelwert .	**0,002 02**	**0,001 97**	**0,002 01**	**0,001 89**	**0,001 99**
Maximalwert. . .	0,002 11	0,002 15	0,002 28	0,002 01	0,002 16
Minimalwert	0,001 96	0,001 83	0,001 79	0,001 84	0,001 76
Mittlere Abweichung v. Mittelwert . . .	± 0,000 05	± 0,000 06	± 0,000 07	± 0,000 05	± 0,000 07
Maxim. Abweichung v. Mittelwert . . .	± 0,000 07_5	± 0,000 16	± 0,000 24_5	± 0,000 07_5	± 0,000 20

Es kann also durchschnittlich mit einem mittleren spezifischen Brechungszuwachs für das Gesamteiweiß von **0,00200** gerechnet werden.

Es ist nach obigem sogar *denkbar*, daß in den untersuchten Seren überhaupt *keine tatsächlichen Unterschiede des spezifischen Brechungszuwachses für Gesamteiweiß* vorhanden sind. Wenn die gefundenen Schwankungen zum Teil wirklichen individuellen Variationen des spezifischen Brechungszuwachses entsprechen, so sind diese *Variationen jedenfalls sehr geringe.*

Die relative Konstanz des spezifischen Brechungszuwachses des Gesamteiweißes rechtfertigt die Vermutung, daß bei den größeren Schwankungen der für Albumin und Globulin gefundenen Refraktionswerte methodische Schwankungen in größerem Ausmaße im Spiele stehen, als bei der mit den geringsten Fehlerquellen bestimmbaren Refraktion des Gesamteiweißes.

In Tabelle VII sind die aus den von *Petschacher, Berger* und *Schretter*, von *Berger* und *Galehr* sowie von mir ermittelten Zahlen gewonnenen Mittelwerte mit den in der Literatur vorliegenden Werten vergleichsweise zusammengestellt.

Tabelle VII.

Spezifischer Brechungszuwachs des Gesamteiweißes bei verschiedenen Autoren.

Extremwerte	Schwankungsbreite	Mittelwert	Autoren	Zahl der Fälle
0,001 70—0,001 75	$\pm$ 0,000 02$_5$	0,001 72	*Reiss*	2 Sera
?	—	0,001 95	*Robertson*	?
0,001 72—0,001 81	$\pm$ 0,000 04$_5$	0,001 78	*Rohrer*	17 Sera, davon 5 Menschensera
0,001 90—0,001 98	$\pm$ 0,000 04	0,001 94	*Neuhausen* und *Rioch*	15 Menschensera
—	—	0,001 98	Dieselben	Hundesera
0,001 95—0,002 00	$\pm$ 0,000 02$_5$	0,001 97	Dieselben	Schweinesera
0,001 81—0,002 38	$\pm$ 0,000 28$_5$	0,002 10	*Arnd* und *Hafner*	20 pathologische Menschensera
0,001 77—0,002 58	$\pm$ 0,000 40$_5$	0,001 96	*Starlinger* und *Hartl*	69 pathologische Menschensera
0,001 83—0,002 15	$\pm$ 0,000 16	0,001 97	*Petschacher*, *Berger* und *Schretter*	32 pathologische Menschensera
0,001 84—0,002 01	$\pm$ 0,000 08$_5$	0,001 89	Dieselben	7 normale Kaninchensera
0,001 79—0,002 28	$\pm$ 0,000 24$_5$	0,002 01	*Berger* und *Galehr*	47 pathologische Menschensera
0,001 76—0,002 16	$\pm$ 0,000 20	0,001 99	Dieselben	23 pathologische Kaninchensera
0,001 96—0,002 11	$\pm$ 0,000 07$_5$	0,002 02	*Schretter*	9 pathologische Menschensera

Die *Mittelwerte des spezifischen Brechungszuwachses für das Serumeiweiß als Ganzes*, die von verschiedenen Autoren mit verschiedenen Methoden erhalten wurden, liegen zwischen 0,00172 und 0,00210.

Die beste Übereinstimmung zeigen folgende Mittelwerte:

0,001 95 *Robertson*,
0,001 96 *Starlinger* und *Hartl*,
0,001 97 *Petschacher*, *Berger* und *Schretter*,
0,002 01 *Berger* und *Galehr*,
0,002 02 *Schretter*.

Robertson, *Starlinger* und *Hartl*, *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* haben für menschliches Serumeiweiß einen identischen Wert von 0,00196 $\pm$ 0,00001 gefunden. Aus den Untersuchungen von *Berger* und *Galehr* ergibt sich ein Mittelwert von 0,00201; *Arnd* und *Hafner* erhalten einen etwas höheren von 0,00210. Aus den vorliegenden eigenen Untersuchungen ergibt sich ein Wert von 0,00202, also eine gute Übereinstimmung mit den Werten anderer Autoren.

Größere Abweichungen zeigen nur die Mittelwerte von *Reiss* und von *Rohrer*, die bei beiden deutlich niedriger, nämlich bei 0,00172 bzw. bei 0,00178 liegen. Es ist wohl denkbar, daß diese Werte in der geringeren Anzahl der Untersuchungen und in der Methode (Bestimmung an sehr lange dialysiertem Eiweiß, gravimetrische Eiweißbestimmung mit zu hohem Eiweißwert?) liegen.

Die *Extremwerte* gehen bei den verschiedenen Untersuchern weit mehr auseinander als die Mittelwerte. Die Extremwerte nach unten stimmen bei den verschiedenen Autoren besser überein (0,00170 bis 0,00196) als die nach oben (0,00175 bis 0,00258).

Die *Schwankungsbreite* ist bei den verschiedenen Autoren sehr verschieden groß. Bei Berücksichtigung der Schwankungsbreite scheiden die Untersuchungen von *Reiss* wegen ihrer geringen Zahl und die von *Robertson* wegen der mir nicht bekannten Zahl der Analysen, aus denen die Mittelwerte berechnet wurden, aus.

Die übrigen Autoren teilen der Größe nach folgende Schwankungen mit:

± 0,000 40	2/5 des Mittelwertes	*Starlinger* und *Hartl*	69 Sera
± 0,000 28	1/4 „ „	*Arnd* und *Hafner*	20 „
± 0,000 25	1/4 „ „	*Berger* und *Galehr*	47 „
± 0,000 16	1/6 „ „	*Petschacher, Berger* und *Schretter*	32 „
± 0,000 07	1/6 „ „	*Schretter*	9 „
± 0,000 04	1/48 „ „	*Neuhausen* und *Rioch*	15 „

Es ist der Verdacht gerechtfertigt, daß bei den größeren Schwankungsbreiten einzelner Untersucher methodische Fehlerquellen die Hauptrolle spielen.

Hier sei zum Schluß noch einmal hervorgehoben, daß bei den genannten Untersuchern (ausgenommen *Reiss* und *Rohrer*) *die Schwankungen der Mittelwerte im Gegensatz zu den Schwankungen vieler Einzelwerte über die rechnerisch aus den Verfahren ermittelte Schwankungsbreite nicht oder nur um weniges hinausgehen, sowie daß in den Untersuchungen von Petschacher, Berger* und *Schretter, Berger und Galehr, Schretter auch die Einzelwerte die methodische Fehlerbreite nur unbedeutend überschreiten. Die Mittelwerte des spezifischen Brechungszuwachses des Gesamteiweißes liegen bei den meisten Autoren so ziemlich zwischen den für isoliertes Albumin und isoliertes Globulin angegebenen Brechungsanteilen.* Es liegen Einzelwerte vor, die mit den letztgenannten Werten nicht ohne weiteres vereinbar erscheinen. Abgesehen von *Reiss* und *Robertson* ist für das Gesamteiweiß keine Refraktion gefunden worden, die niedriger ist als der für reines Albumin angegebene Refraktionswert; dagegen sind von *Starlinger* und *Hartl*, sowie von *Arnd* und *Hafner* Refraktionen für das Gesamteiweiß angegeben worden, die höher sind als *Robertson* für reines Globulin (0,00229) angeführt hat, nämlich bei *Starlinger* und *Hartl* 0,00258, bei *Arnd* und *Hafner* 0,00238. Die eigenen Untersuchungen ergeben für das Gesamteiweiß einen Mittelwert, der innerhalb der Fehlergrenzen identisch ist mit dem aus den isolierten, nicht eingeengten Albuminlösungen (Gesamteiweiß 0,00202, Albumin 0,00200, siehe II. Mitteilung).

Literatur.

Arnd und *Hafner*, diese Zeitschr. **167**, 440, 1926. — *Berger* und *Galehr*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. (im Druck). — *Chevalier* und *Chalier*, C. r. Soc. Biol. **93**, 173, 1925. — *Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chem. — *Kauder*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **16**, 322, 1883. — *Neuhausen* und *Rioch*, Journ. of biol. Chem. **55**, 353, 1923. — *Petschacher*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **41**, 142, 1924ff. — *Petschacher*, *Berger* und *Schretter*, ebendaselbst **50**, 449, 1926. — *Pinkussen*, Mikromethodik. — *Porges* und *Spiro*, Hofmeisters Beitr. **3**, 276, 1902. — *Reiss*, ebendaselbst **4**, 150, 1904. — *Derselbe*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **10**, 531, 1916. — *Derselbe*, Abderhaldens Handb., Abt. II, Teil 2, Heft 1, S. 817. — *Robertson*, Journ. of biol. Chem. **11**, 179, 1912; **22**, 223, 1923. — *Rohrer*, Schweiz. med. Wochenschr. **22**, 1922. — *Schorer*, Korresp. f. Schweizer Ärzte **43**, 1523, 1913. — *Starlinger* und *Hartl*, diese Zeitschr. **160**, 113, 1925.

Der spezifische Brechungszuwachs von Serumalbumin und Serumglobulin.

Von

Gottfried Schretter.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität in Innsbruck.)

(Eingegangen am 9. August 1926.)

In Fortsetzung der in der vorausgehenden Mitteilung gebrachten Untersuchungen über den spezifischen Brechungszuwachs des Gesamteiweißes wurde an denselben Seren und in der gleichen Ascitesflüssigkeit auch der spezifische Brechungszuwachs der Albumin- und Globulinfraktion bestimmt, und zwar sowohl direkt an den isolierten Fraktionen als indirekt aus dem nach Halbsättigung des Serums mit Ammonsulfat und Zentrifugieren erhaltenen Ammonsulfat-Eiweißgemisch.

I. Die direkte Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses für Albumin und Globulin an den isolierten Fraktionen.

Der natürliche Weg zur Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses der Serumalbumine und der Serumglobuline ist die Reindarstellung derselben und die Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses an diesen möglichst reinen Eiweißlösungen. Dieser Weg ist zunächst auch von den meisten Untersuchern betreten worden. Die Bedenken, die sich dagegen aus einer etwaigen Veränderung der Eiweißkörper während der Reindarstellung ergeben, sollen im nächsten Abschnitt erörtert werden.

Über den solchermaßen ermittelten spezifischen Brechungszuwachs für isoliertes Serumalbumin und Serumglobulin liegen in der Literatur Angaben vor von *Reiss*, *Robertson*, *Schorer*, *Rohrer*, *Starlinger* und *Hartl*, *Arnd* und *Hafner*.

Methoden.

Um beurteilen zu können, ob und welche Einflüsse die Methodik der Reindarstellung und die Methodik der Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses auf die Resultate nimmt, muß auf die Methodik der genannten Untersucher sowie auf die eigene Methode und deren Fehlermöglichkeiten und Fehlerbreite eingegangen werden.

1. *Reiss* hat die Darstellung der einzelnen Unterfraktionen durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat (vermutlich im 1 : 2 verdünnten Serum) vorgenommen. Um möglichste Reinheit der einzelnen Fraktionen zu sichern, hat er die *Grenzfraktionen beseitigt*. Er erhielt so bis zu 32 Proz. Sättigung das „Euglobulin", von 36 bis 39 Proz. das „Pseudoglobulin I", von 42 bis 50 Proz. das „Pseudoglobulin II". Diese wurden in destilliertem Wasser gelöst, noch *zweimal umgefällt* und dann *4 bis 6 Wochen* gegen Leitungswasser *dialysiert*.

Aus dem Filtrat des mit Ammonsulfat halbgesättigten Serums wurde durch n/5 Schwefelsäure das kristallisierte Albumin gewonnen und zweimal umgefällt. Der noch in Lösung befindliche Rest wurde als amorphes Albumin betrachtet. Beide Albumine wurden gleichfalls 4 bis 6 Wochen dialysiert.

Das Euglobulin wurde nach der Dialyse durch Salzzusatz gelöst, und zwar bei einer Probe durch Zufügen einer gemessenen Menge einer konzentrierten NaCl-Lösung. Der Brechungsexponent einer gleichprozentigen NaCl-Lösung wurde dann abgezogen. Bei einer anderen Probe wurde NaCl in Substanz zugegeben, der Salzgehalt in der Lösung quantitativ bestimmt, der Brechungswert berechnet und abgezogen.

Zur Bestimmung der Eiweißrefraktion mußte der Salzgehalt des dialysierten Eiweißes bestimmt und der darauf entfallende Brechungsanteil abgezogen werden. Dies geschah nach Erreichung der Ammonsulfatfreiheit durch Erhitzung bis zur Verkohlung, Auslaugen und Veraschung nach bekannter Methode. Es zeigte sich, daß der Salzgehalt eiweißreicher Lösungen noch meßbar, der eiweißarmer Lösungen dagegen gleich dem des Leitungswassers war. Es wurde daher später der Salzgehalt der dialysierten Eiweißlösungen dem des Leitungswassers gleichgesetzt.

Die Bestimmung des Eiweißgehalts erfolgte durch Fällung mit 3 bis 4 Volumen Alkohol und einstündiges Erhitzen auf 80°, Trocknen und Wägen, Abzug der Asche.

In einem Falle werden Doppelbestimmungen gemacht. Die Zahl der untersuchten Sera ist in der Orginalarbeit nicht angegeben.

2. *Robertson.* Genauere Angaben über die Methode, welche *Robertson* zur Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses an isolierten Albuminen und Globulinen angewendet hat, sind mir nicht bekannt.

3. *Rohrer* verwendet dieselbe Methode, welche er für die Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses des Gesamteiweißes benutzte. Er stellt im 1 : 2 verdünnten Serum die Fraktionen durch Halbsättigung bzw. Ganzsättigung mit Ammonsulfat dar, filtrierte, *wusch* mit halb- bzw. ganzgesättigter Ammonsulfatlösung. Es ist nicht ersichtlich, ob er die Fraktionen umfällte. Näheres siehe erste Mitteilung.

Mit Unterbrechung der Dialyse wurde einige Stunden im Luftstrom eines Niederdruckgebläses bei Zimmertemperatur eingeengt.

4. *Schorer* fällte das Globulin durch Halbsättigung des 1 : 2 verdünnten Serums, löste den Niederschlag in so viel destilliertem Wasser, daß das ursprüngliche Volumen des Serums resultierte, und *fällte nun ein zweites Mal.* Nach mehrmaligem *Waschen mit halbgesättigtem Ammonsulfat* und nochmaligem Auflösen in entsprechendem Volumen Aqua dest. wurde zunächst gegen strömendes Leitungswasser und später gegen destilliertes Wasser dialysiert, bis kein Ammonsulfat mehr nachweisbar war. Der getrübte Inhalt der Dialyseschläuche wurde in ein Becherglas gegeben und der darin enthaltene Niederschlag von Globulin, das durch Salzverarmung infolge der Dialyse teilweise ausgefallen war, mit 1, 2, 3 Tropfen einer

20proz. Lösung von Na_2CO_3 in eine schöne, klare Lösung übergeführt. Das Filtrat der Globulinfällung wurde mit feingepulvertem, reinstem Ammonsulfat versetzt, bis sich nichts mehr löste, einige Stunden stehengelassen und dann filtriert, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und in einer dem Serumvolumen gleichen Menge destillierten Wassers gelöst. Die Dialyse bis zur Entfernung des Ammonsulfats ergab meist ganz klare Lösungen. Nötigenfalls wurde filtriert. Von diesen Lösungen wurde der Brechungsexponent bestimmt und die Eiweißmenge durch den N-Gehalt nach *Kjeldahl*, einmal durch Wägung (Alkoholfällung) ermittelt. Die Konzentrationen der untersuchten Lösungen sind im Original nicht angegeben.

5. *Starlinger* und *Hartl* nahmen im 1 : 6 verdünnten Serum die Fällung mit Ammonsulfat vor. *Ohne* weitere Auflösung und *Umfällung* wurden die gefällten Fraktionen in Pergamentschläuchen 3 Tage gegen fließendes Wasser und 1 Tag gegen eine 0,9proz. NaCl-Lösung oder Normosal unter mehrfachem Wechsel der Außenflüssigkeit dialysiert. Das Dialysat wurde scharf zentrifugiert und die Refraktion gemessen. Den Eiweißgehalt bestimmten sie mit ihrer gravimetrischen Methode. Sie bemerken besonders, daß das dialysierte Globulin niemals quantitativ in Lösung ging.

6. *Arnd* und *Hafner* bringen vorläufig nur eine Auswahl extremer Werte ihrer Untersuchungen und machen keine methodischen Angaben.

In den eigenen Versuchen gestaltete sich die Fraktionierung, Reinigung und Untersuchung der Serum-Eiweißkörper folgendermaßen:

1. Aussalzen und Umfällen.

Klares Serum wurde mit der gleichen Menge einer halbgesättigten neutralen Ammonsulfatlösung versetzt und gut durchgemischt, wobei jedoch Schaumbildung vermieden wurde. Die Mischung blieb 12 Stunden stehen und wurde öfter mit einem Glasstabe gut durchgerührt. Das bei dieser Halbsättigung ausgefällte Globulin wurde abfiltriert und auf dem Filter mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen. Das Waschwasser wurde verworfen. In dem ersten aufgefangenen Filtrat wurde durch Zusatz von Ammonsulfat in Substanz (etwa 40 g pro 100 ccm Filtrat) das Albumin gefällt, ebenfalls filtriert und mit einer gesättigten Lösung von Ammonsulfat gewaschen.

Die gewaschenen Niederschläge von Globulin und Albumin wurden in wenig destilliertem Wasser gelöst. Die für die Löslichkeit des Euglobulins notwendige Salzkonzentration war infolge des vorausgegangenen Ammonsulfatzusatzes, der ja zum Teil dem Eiweißniederschlag anhaftet, vorhanden. Nötigenfalls wurde nun filtriert und wiederum durch Zusatz von gesättigter Ammonsulfatlösung zu gleichen Teilen (bzw. von Ammonsulfat in Substanz) gefällt. Dieses Verfahren wurde mit jeder Fraktion je dreimal vorgenommen. Als Fällungsmittel wurde das von *Merck* hergestellte Ammonium sulfuricum purissimum *pro analysi* verwendet. Bei einigen Seren wurde für die erstmaligen Fällungen nicht analysenreines Salz verwendet. Für die letzte Umfällung wurde jedoch stets das analysenreine Salz genommen, da die Reinheit des gewöhnlichen purum nicht allzu groß ist.

2. Dialyse der fraktionierten Albumine und Globuline.

Die nach dem dreimaligen Umfällen, also nach der vierten Aussalzung erhaltenen Niederschläge (teilweise in destilliertem Wasser gelöst) wurden

in Pergamentdialysierhülsen (*Schleicher* und *Schüll*) etwa bis zu ½ bis $^1/_3$ Höhe der Hülse eingefüllt und gegen fließendes Wasser dialysiert. Und zwar wurde die Albuminfraktion bis zur vollständigen Ammonsulfatfreiheit (N-Probe mit *Nessler*schem Reagens) dialysiert, was 6 bis 8 Tage in Anspruch nahm. Die Globulinfraktion wurde jedoch nur etwa 36 Stunden gegen das fließende Wasser dialysiert, da sonst infolge des Salzmangels der Eiweißlösung eine Denaturierung eintritt, die Lösung sich trübt und schließlich Eiweiß ausfällt (*Hammarsten*). Um das dann stets noch vorhandene Ammonsulfat weiter zu entfernen, wurde nun gegen eine Normosallösung, und zwar um Zersetzung hintanzuhalten im Eisschrank einige Tage unter täglich drei- bis viermaligem Wechsel der Außenflüssigkeit bis zum negativen Ausfall der *Nessler*schen Probe weiter dialysiert. Das *Dialysierverfahren* war also ein *schonendes* und vermied die sichtbare Denaturierung, sowie Eiweißverluste durch Ausfallen von Euglobulin u. a.

Die so gereinigten Lösungen von Serumalbumin bzw. Serumglobulin gelangten, nachdem sie nötigenfalls filtriert worden waren, einerseits direkt zur Untersuchung („*isolierte, nicht eingeengte* Fraktionen"); andererseits nach Einengung im Luftstrom („*isolierte, eingeengte* Fraktionen").

3. Die Einengung.

Diese erfolgte an den ersten Proben teils im Vakuum, das durch eine Wasserstrahlluftpumpe erzeugt wurde, teils dadurch, daß ein mit Chlorcalcium getrockneter Luftstrom mittels einer Pumpe über die Lösung geleitet wurde. Da sich diese Methode als zu langsam erwies und Gefahr bestand, daß indessen die Eiweißlösungen bakteriell zersetzt und denaturiert würden, wurde vermittels eines Ventilators Luft, die durch einen elektrischen Ofen auf 30°, maximal 40° erwärmt war, über die in großen Uhrschalen befindlichen Eiweißlösungen geführt. Zum Schutz gegen Verunreinigungen, sowie zur besseren Ausnutzung des Luftstroms diente nach Art des *Faust-Heim*schen Apparats ein länglicher Kasten aus Holz, in dem die Uhrschalen aufgestellt wurden und durch den der warme Luftstrom geleitet wurde. In einigen Fällen, bei denen dies in den Protokollen ausdrücklich vermerkt ist, war die Eintrocknung zu weit vorgeschritten, und es wurde daher mit destilliertem Wasser oder Normosal wieder gelöst. Nötigenfalls wurde vor der weiteren Untersuchung durch gehärtete Filter filtriert. Diese Lösungen werden als „isolierte eingeengte Fraktionen" bezeichnet.

4. Die Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses.

Zur Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses dieser isolierten und gereinigten Albumin- und Globulinlösungen wurde an ihnen einerseits der Eiweißgehalt nach *Kjeldahl* nach Abzug des Nichteiweißstickstoffs (= nichtkoagulablen N), andererseits die Refraktion unter Abzug der Restrefraktion ermittelt. Bei Bestimmung der letzteren mußte bei den Albuminen teilweise zu der nach *Robertson* verwendeten n/25 Essigsäure ein Zusatz 0,9proz. NaCl gemacht werden, da sonst infolge des Salzmangels durch die Dialyse die Essigsäure-Hitzefällung eine unvollständige war oder überhaupt mißlang. Die Berechnung bleibt dabei dieselbe, nur ist in diesem Falle statt der Refraktion der n/25 Essigsäure die der n/25 Essigsäure + 0,9proz. NaCl zu messen und in Rechnung zu bringen.

Gegen die Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses an in solcher Weise gewonnenen Eiweißfraktionen sind drei prinzipielle Einwendungen möglich:

1. Sie sind nicht ganz rein.

2. Sie sind unter Eiweißverlusten dargestellt, enthalten also nicht die ganze Albumin- bzw. Globulinfraktion.

3. Das Eiweiß ist durch die mehrtägige Berührung mit den hohen Konzentrationen eines serumfremden Salzes, durch die Dialyse und andere Maßnahmen gegenüber dem nativen Zustand im Blutserum verändert.

Zu 1. Die auf diese Weise dargestellten Albumin- und Globulinfraktionen sind in der Tat nicht absolut rein. Sie enthalten unter anderem die bei halber Sättigung bzw. Ganzsättigung mit Ammonsulfat ausfallenden (ausgesalzenen oder vom Niederschlag mitgerissenen) adialysablen Nichteiweißstoffe des Serums, soweit sie nicht beim dreimaligen Umfällen mit Ammonsulfat nachträglich entfernt wurden.

Als solche Verunreinigungen kommen in Betracht:

1. *Albumin in der Globulinlösung und umgekehrt* Globulin in der Albuminlösung: a) Ungenaue Trennung von Globulin und Albumin durch Aussalzen in dem nur 1 : 2 verdünnten Serum oder durch etwa im Serum selbst gelegene Momente, welche die Fällungsgrenzen des Globulins und Albumins verschieben. b) Die Globuline werden bei der Umfällung stets mit einer Ammonsulfatkonzentration ausgesalzen, die den Salzgehalt des Niederschlags nicht berücksichtigt. Und zwar kommt einerseits 1. ein zu hoher Ammonsulfatgehalt in Frage durch die Eintrocknung bei der Filtration, welche zum Teil dadurch vermieden wurde, daß die Trichter mit großen Uhrschalen, an denen feuchte Wattebausche befestigt waren, bedeckt wurden. Zu hoher Salzgehalt hätte Mitfällung von Albumin zur Folge. 2. Durch Nichtberücksichtigung des Volumens des Niederschlags könnte ein zu niedriger Ammonsulfatgehalt resultieren, wodurch Globulin sich lösen würde und so der Bestimmung entginge. Diese Fehler können aber nicht bedeutend sein.

2. *Albumosen* und etwaige andere aussalzbare, aber adialysable Eiweißbausteine.

3. *Serumnucleoproteid* sowie *Serummucoid*, die beide bei der fraktionierten Aussalzung durch Ammonsulfat zusammen mit dem Serumglobulin ausfallen. Eine quantitative Entfernung derselben ist nicht so ohne weiteres möglich, und da diese Stoffe auch nur in ganz geringen Quantitäten vorhanden sind (Serummucoid ist im normalen Blute in einer Menge von 0,02 bis 0,09 Proz. vorhanden), wurde, wie üblich, auf ihre Entfernung verzichtet.

4. *Fette* und *Lipoide*, soweit sie nicht durch das Umfällen entfernt werden. Zu ihrer quantitativen Entfernung müßte man das Eiweiß trocknen und im getrockneten Zustande einer quantitativen Extraktion unterziehen.

5. Als weitere Verunreinigungen wären noch zu erwähnen Enzyme, Immunkörper, Fibrinferment, Normalantikörper, die dem Globulin, und Farbstoffe, die dem Albumin und Globulin anhaften. Auch bei diesen Stoffen ist die Menge wahrscheinlich zu gering, um bei der Ermittlung des

spezifischen Brechungszuwachses des Albumins bzw. des Globulins eine Rolle zu spielen. Teilweise werden diese Stoffe auch beim wiederholten Umfällen oder bei der Dialyse entfernt.

Alle diese Stoffe werden als Eiweiß gerechnet. In der Mehrzahl der untersuchten Eiweißfraktionen scheint der Fehler nicht bedeutend zu sein, denn die Übereinstimmung des spezifischen Brechungszuwachses der Fraktionen war eine recht gute. Ob diese Fehler möglicherweise die Schuld tragen an den ausnahmsweise stark aus der Reihe fallenden Werten sowie an den im mittleren Ausmaß gefundenen Unterschieden, kurz, wie groß der dadurch bedingte Fehler werden kann, müßten weitere Untersuchungen lehren. Da die Entfernung dieser Stoffe ohne teilweise Denaturierung des Eiweißes nicht recht möglich ist, mußten diese Fehler wie von den anderen Untersuchern auf diesem Gebiete mit in Kauf genommen werden.

Zu 2. Dieser Einwand trifft insofern zu, als im Interesse der Reinigung auf eine streng quantitative Isolierung verzichtet werden mußte. Die Waschwässer wurden verworfen, ebenso beim Einengungsverfahren die angetrockneten Randpartien. *Starlinger* und *Hartl* meinen, daß gerade die beim Isolierungsverfahren verlorenen Eiweißanteile besonders labil und von besonderem Einfluß auf den spezifischen Brechungszuwachs seien. Einen Beweis für diese Annahme bringen aber ihre Untersuchungen nicht.

Zu 3. Diese Einwendung wurde unter anderen von *Starlinger* und *Hartl* erhoben. Sie ist zunächst auch nur eine Annahme und müßte ebenfalls erst bewiesen werden.

Der Vergleich des an den isolierten Fraktionen gefundenen Brechungszuwachses mit dem an dem unveränderten Serum bestimmten spezifischen Brechungszuwachs des Gesamteiweißes wird eine gewisse Handhabe für die Beurteilung all dieser Einwände liefern.

Die mit der beschriebenen Methodik erhaltenen Werte für den spezifischen Brechungszuwachs isolierter Albumine und Globuline sind in den Tabellen I und II übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle I.

Der spezifische Brechungszuwachs für die **isolierten Albumine** (direkte Bestimmungsmethode).

Nr.	Nicht eingeengte Albumine			Eingeengte Albumine		
	Eiweiß g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz v. Mittelwert	Eiweiß g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz v. Mittelwert
3	3,90	0,002 12 ± 0,000 07	+ 0,000 12	8,59	0,001 78 ± 0,000 02	− 0,000 10
4	—	—	—	10,59	0,002 07 ± 0,000 02	+ 0,000 19
5	4,39	(0,002 75) ± 0,000 08	—	8,63	(0,002 44) ± 0,000 01	—
6	3,94	0,001 92 ± 0,000 06	− 0,000 08	15,76	0,002 02 ± 0,000 01	+ 0,000 14
7						
8	1,62	0,002 12 ± 0,000 06	+ 0,000 12	5,06	0,001 95 ± 0,000 03	+ 0,000 07
9	—	—	—	2,81	0,001 84 ± 0,000 04	− 0,000 04
10	2,01	0,002 07 ± 0,000 06	+ 0,000 07	5,09	0,001 84 ± 0,000 04	− 0,000 04
11, I	3,19	0,001 93 ± 0,000 08	− 0,000 07	7,48	0,001 81 ± 0,000 02	− 0,000 07
11, II	2,41	0,001 96 ± 0,000 10	− 0,000 04	7,31	0,001 73 ± 0,000 01	− 0,000 15
12	2,59	0,001 91 ± 0,000 04	− 0,000 09	4,73	0,001 90 ± 0,000 01	− 0,000 02

Tabelle I (Fortsetzung).

	Nicht eingeengt	Eingeengt
Maximalwert	0,002 12	0,002 07
Mittelwert	*0,002 00*	*0,001 88*
Minimalwert	0,001 91	0,001 73
Maximale Abweichung vom Mittelwert	± 0,000 10	± 0,000 17
Mittlere „ „ „	± 0,000 08	± 0,000 09
Mittlere Fehlerbreite, berechnet aus Doppelbestimmungen	± 0,000 07	± 0,000 02

Tabelle II.

Der spezifische Brechungszuwachs für die **isollerten Globuline** (direkte Bestimmungsmethode).

Nr.	Nicht eingeengte Globuline			Eingeengte Globuline		
	Eiweiß g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz v. Mittelwert	Eiweiß g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz v. Mittelwert
3	—	—	—	1,64	0,001 93 ± 0,000 03	− 0,000 06
4	2,08	0,002 34 ± 0,000 03	+ 0,000 15	3,87	0,002 00 ± 0,000 06	+ 0,000 01
5a	3,58	0,002 18 ± 0,000 04	− 0,000 01	4,74	0,001 93 ± 0,000 03	− 0,000 06
5b	—	—	—	4,46	0,002 02 ± 0,000 04	+ 0,000 03
5c	—	—	—	6,44	0,002 04 ± 0,000 04	+ 0,000 05
6	4,41	0,002 33 ± 0,000 07	+ 0,000 14	8,60	0,002 04 ± 0,000 01	+ 0,000 05
7	31,69	0,002 28 ± 0,000 02	+ 0,000 09	—	—	—
9a	3,51	0,002 08 ± 0,000 02	− 0,000 11	4,07	0,002 02 ± 0,000 04	+ 0,000 03
9b	—	—	—	8,65	0,001 93 ± 0,000 02	− 0,000 06
10	2,89	(0,002 70) ± 0,000 02	—	7,00	0,001 95 ± 0,000 01	− 0,000 04
11, I	4,27	0,002 20 ± 0,000 02	+ 0,000 01	8,62	0,002 13 ± 0,000 02	+ 0,000 14
11, II	3,84	0,002 06 ± 0,000 02	− 0,000 13	6,30	0,002 06 ± 0,000 02	+ 0,000 07
12a	2,69	0,002 09 ± 0,000 04	− 0,000 10	4,69	0,001 96 ± 0,000 02	− 0,000 03
12b	—	—	—	2,24	0,001 88 ± 0,000 05	− 0,000 11

	Nicht eingeengt	Eingeengt
Maximalwert	0,002 34	0,002 13
Mittelwert	*0,002 19*	*0,001 99*
Minimalwert	0,002 06	0,001 88
Maximale Abweichung vom Mittelwert	± 0,000 14	± 0,000 12
Mittlere „ „ „	± 0,000 09	± 0,000 05
Mittlere Fehlerbreite, berechnet aus Doppelbestimmungen	± 0,000 03	± 0,000 03

Jede isolierte Fraktion wurde, wie erwähnt, zweimal untersucht, nämlich:

1. Die aus der Dialyse unmittelbar hervorgegangenen Lösungen, die eine niedere Konzentration (Albumin 1,62 bis 4,39 g-Proz., Globulin 2,08 bis 4,41 g-Proz.) aufwiesen („spezifischer Brechungszuwachs der *nicht eingeengten isolierten* Fraktionen").

2. Nach Einengung der ersten Lösung im leicht erwärmten Luftstrom, mit Konzentrationen für Albumin von 2,81 bis 15,76 g-Proz., für Globulin von 1,64 bis 8,65 g-Proz. („spezifischer Brechungszuwachs der *eingeengten isolierten* Fraktionen").

Ergebnisse.

Die Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses an isoliertem Albumin und Globulin hat folgende Ergebnisse gezeigt:

1. Der spezifische Brechungszuwachs für *Globulin* und für *Albumin* aus einem und *demselben Serum* war *nie gleich* und *im selben Serum für Globulin stets höher* als für Albumin. Die Werte wichen auch von den für das Gesamteiweiß erhobenen Mittelwerten ab.

2. Während, wie gesagt, am gleichen Serum der Globulinwert stets höher war als der Albuminwert, erwies sich die absolute Höhe der Werte insofern nicht als charakteristisch für Globulin und Albumin, als in *verschiedenen Seren einige Male Globulinwerte* gefunden wurden, die *niedriger* waren als die *Albuminwerte anderer Seren* und umgekehrt (Minimalwert für Globulin 0,00206, Maximalwert für Albumin 0,00212).

3. Die spezifischen Brechungszuwachse für *Globulin aus verschiedenen Seren* erwiesen sich als verschieden. Das gleiche gilt für das Albumin.

Die *Ursachen dieser individuellen Abweichungen des spezifischen Brechungszuwachses der isolierten Globuline und Albumine* können zweifacher Natur sein. Es sind zu unterscheiden:

1. *Methodisch bedingte Schwankungen*, deren Breite, soweit sie den noch zu erwähnenden Bestimmungsfehler betrifft, aus den überall durchgeführten Doppelbestimmungen ohne weiteres zu berechnen ist und als $\pm$-Fehler bei den einzelnen Werten verzeichnet wurde.

2. *Wirkliche individuelle Schwankungen*, bedingt durch eine von Serum zu Serum wechselnde physikalische und chemische Struktur des Albumins und des Globulins.

1. Methodische Schwankungen.

Diese setzen sich zusammen aus Bestimmungsfehlern und Darstellungsfehlern. Es ist nämlich zu untersuchen:

a) Welche Schwankungsbreite des Quotienten R/E ergibt sich aus der Fehlerbreite der refraktometrischen Untersuchung und aus der durch Doppelbestimmungen ermittelten Fehlerbreite der kjeldahlometrischen Eiweißanalyse. (*Bestimmungsfehler.*)

b) Welche Schwankungsbreite ergibt sich bei Bestimmungen an parallel isolierten Fraktionen desselben Serums? (*Darstellungsfehler.*)

a) Bestimmungsfehler.

Für die Refraktion der untersuchten Lösungen wurde der Mittelwert mehrerer Ablesungen gebucht. Die Schwankungsbreite wurde nicht notiert. Es kann aber nach vielfältigen Erfahrungen der Klinik als Fehler der Refraktionsbestimmung generell mit einer $\pm$-Abweichung von $n_D = 0{,}00004$ gerechnet werden (vgl. 1. Mitteilung).

Die Fehlerbreite der kjeldahlometrischen Eiweißuntersuchungen wurden von Fall zu Fall ermittelt und notiert.

Die in jedem Fall vorgenommene Kombination der Maximalwerte der Refraktion mit den Minimalwerten des Eiweißgehalts und umgekehrt ergab die in den Tabellen vermerkten Abweichungen.

Der aus Doppelbestimmungen berechnete *durchschnittliche „Bestimmungsfehler" des spezifischen Brechungszuwachses für Albumin und Globulin betrug* $\pm$ *0,00004, der extreme Fehler war in diesen Untersuchungen* $\pm$ *0,00010, der minimale Fehler* $\pm$ *0,00001.*

Wirkliche Unterschiede des spezifischen Brechungszuwachses zwischen Albuminen bzw. Globulinen aus verschiedenen Seren können demnach nur dann angenommen werden, wenn die Differenz größer ist als die für jedes der zu vergleichenden Albumine (Globuline) ermittelten Bestimmungsfehler. Dazu kommen noch die durch den Darstellungsfehler gegebenen weiteren Einschränkungen.

b) Darstellungsfehler.

Ein Urteil über den Einfluß der Isolierungsmaßnahmen auf den spezifischen Brechungszuwachs wurde durch parallele Isolierung und Reinigung zweier Albumin- und zweier Globulinfraktionen aus einer Ausgangsmischung (Ascitesflüssigkeit) gewonnen. Dabei ergaben sich folgende Resultate:

Albumin I:	nicht eingeengt	0,00193 $\pm$ 0,00008
	eingeengt	0,00181 $\pm$ 0,00001
Albumin II:	nicht eingeengt	0,00196 $\pm$ 0,00010
	eingeengt	0,00187 $\pm$ 0,00002
Globulin I:	nicht eingeengt	0,00210 $\pm$ 0,00002
	eingeengt	0,00213 $\pm$ 0,00002
Globulin II:	nicht eingeengt	0,00206 $\pm$ 0,00001
	eingeengt	0,00208 $\pm$ 0,00002

Daraus ist zu entnehmen:

1. *Zwei parallel dargestellte Albumine* in der *nicht eingeengten Lösung* gaben Werte, die innerhalb der aus Doppelbestimmungen zu errechnenden Schwankungsbreite übereinstimmten, also als *identisch* angesehen werden können (Differenz $\pm 0{,}00001_5$).

2. *Zwei parallel dargestellte Globuline* zeigen in der nicht eingeengten (und der eingeengten) Lösung im Gegensatz zu den *Albuminen Ab-*

weichungen, die über die aus Doppelbestimmungen errechnete Schwankungsbreite hinausgehen.

Globulin I zeigt bei der nicht eingeengten, wie bei der eingeengten Lösung höhere Werte als Globulin II, und zwar weisen nicht eingeengt I gegenüber nicht eingeengt II ungefähr die gleichen Differenzen auf, wie eingeengt I gegenüber eingeengt II. (Die Differenz der Werte für die nicht eingeengten Lösungen beträgt $\pm 0{,}00003_5$, für die eingeengten Lösungen $\pm 0{,}00003_5$.)

3. *Änderungen des spezifischen Brechungszuwachses durch das Isolierungsverfahren* waren in diesem Falle bei den *Albuminen* überhaupt *nicht nachweisbar* und bei den *Globulinen* waren sie *nicht bedeutend*.

Sie betrugen bei den Globulinen $\pm 0{,}00007$, übertrafen also die aus den Doppelbestimmungen in diesem Falle sich ergebende Schwankungsbreite. Daß die Unterschiede zwischen parallel isolierten Fraktionen beim Globulin größer als beim Albumin sind (0,00220 und 0,00206 gegenüber 0,00193 und 0,00196 bei den nicht eingeengten Fraktionen) könnte ein Hinweis auf die größere Labilität der Globuline gegenüber der Darstellungsmethode sein.

4. Auch hier ist (s. auch unten) festzustellen, daß die Einengung den spezifischen Brechungszuwachs verändern *kann*, und zwar im Sinne einer Verminderung (vgl. Albumin I. und II., bei denen die Verminderung deutlich über die aus den Doppelbestimmungen errechnete Fehlerbreite hinausgeht). Sie muß es jedoch nicht, wie die Übereinstimmung bei Globulin I und II zeigt.

Aus diesem Versuch, dessen Ergebnis durch Wiederholung auf eine breitere Basis gestellt werden muß, ist für die Beurteilung jener Meßergebnisse, für die doppelte Isolierungen nicht vorliegen, der Schluß zu ziehen, daß es zwar einerseits *möglich ist, Fraktionen mit identischem spezifischen Brechungszuwachs herzustellen*, daß aber bei allen Versuchen, bei denen dies nicht geschehen ist, und zwar besonders bei den Globulinen, mit der *Möglichkeit* gerechnet werden muß, daß zu dem Bestimmungsfehler noch ein *Darstellungsfehler* hinzukommt, der durch unvermeidliche Ungleichheiten in der Methodik der Fraktionierung zustande kommen kann.

In den vorliegenden Untersuchungen ist eine weitere, ebenfalls auf gewisse, wenn auch nicht bedeutende Einflüsse der Methodik weisende Gesetzmäßigkeit zu erkennen, nämlich die Möglichkeit und Häufigkeit einer *Beeinflussung des spezifischen Brechungszuwachses durch das Einengungsverfahren im Sinne einer Verminderung.*

Vergleicht man nämlich den spezifischen Brechungszuwachs, welcher aus den nicht eingeengten und aus den eingeengten Lösungen gewonnen wurde, so findet man:

Globuline Nr.	Nicht eingeengt	Eingeengt	Differenz
4	0,002 34	0,002 00	— 0,000 34
5	0,002 18	0,001 93	— 0,000 25
		0,002 02	— 0,000 16
		0,001 96	— 0,000 22
6	0,002 33	0,002 04	— 0,000 29
9	0,002 08	0,002 02	— 0,000 05
10	0,002 70 (?) *)	0,001 95	— 0,000 75 (?) *)
11 a	0,002 20	0,002 13	— 0,000 07
11 b	0,002 06	0,002 01	— 0,000 05
12	0,002 09	0,001 96	— 0,000 13
		0,001 88	— 0,000 21

*) Ist wegen des nicht aus der Reihe fallenden Wertes der zugehörigen eingeengten Fraktion wohl als Fehlbestimmung zu werten.

Albumine Nr.	Nicht eingeengt	Eingeengt	Differenz
3	0,002 12	0,001 78	— 0,000 34
5	0,002 75	0,002 44	— 0,000 31
6, 7	0,001 92	0,002 02	+ *0,000 10*
8	0,002 12	0,001 95	— 0,000 17
10	0,002 07	0,001 84	— 0,000 23
11	0,001 93	0,001 81	— 0,000 12
	0,001 96	0,001 73	— 0,000 23
12	0,001 91	0,001 90	— 0,000 01

Mit Ausnahme des Albumins von Serum Nr. 6 sind also durchweg nicht unbeträchtlich niedrigere Werte für die eingeengten Lösungen gegenüber den nicht eingeengten gefunden worden.

Besonders deutlich zeigt sich der Unterschied in dem zweimal eingeengten Globulin des Serums Nr. 9.

Nr.	Konzentration g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz
9	3,51	0,002 08 ± 0,000 01	0
9 a	4,07	0,002 02 ± 0,000 03	0,000 06
9 b	8,65	0,001 93 ± 0,000 01	0,000 15

Das Globulin des Serums Nr. 5 dagegen zeigt dies nicht:

Nr.	Konzentration g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz
5	3,58	0,002 18 ± 0,000 03	0
5 b	4,46	0,002 02 ± 0,000 03	0,000 16
5 c	6,44	0,002 04 ± 0,000 04	0,000 14

Es ergibt sich also hier, daß nach dem Absinken des Wertes durch die erste Einengung eine weitere Einengung keinen nochmaligen herabsetzenden Effekt hat. Man kann vielleicht daraus schließen, daß die Einengung auch

so schonend erfolgen kann, daß der spezifische Brechungszuwachs nicht verändert wird, oder aber daß die Verminderung desselben durch die Einengung nur bis zu einem bestimmten Grad erfolgt und dann sistiert.

Die Tendenz des Einengungsverfahrens zu einer Verminderung des spezifischen Brechungszuwachses geht auch aus den Mittelwerten eindeutig hervor:

	Mittelwert für Albumin	Mittelwert für Globulin
Nicht eingeengt	0,002 00	0,00 219
Eingeengt	0,001 88	0,00 199

Die Refraktionsverminderung durch Einengung war bei 19 eingeengten Lösungen zwölfmal, also in mehr als der Hälfte der Fälle größer als — 0,000 14. Eine höhere Refraktion (+ 0,000 10) nach dem Einengen wurde nur einmal beobachtet.

Diese Refraktionserniedrigung geht also in den meisten Proben über den bei jeder Probe ermittelten maximalen Bestimmungsfehler hinaus. Der Grund der Refraktionserniedrigung kann entweder darin gelegen sein, daß Refraktion und Gewicht der Eiweißlösungen nicht direkt proportional sind, oder darin, daß das Eiweiß durch das Einengungsverfahren verändert wurde. Da Beziehungen zwischen spezifischem Brechungszuwachs und Konzentration, die für die erste Möglichkeit sprechen würden, in den vorliegenden Resultaten nicht gefunden werden können, möchte ich mich eher für die zweite Möglichkeit entscheiden.

Um den Einfluß des *Eintrocknens* kennenzulernen, wurde noch folgender Versuch gemacht:

Nr. 9.	Globulin nicht eingeengt	0,00208 ± 0,00001
Nr. 9a.	Globulin eingeengt	0,00193 ± 0,00001
Nr. 9b.	Globulin eingetrocknet, in destilliertem Wasser gelöst, mit Normosal verdünnt	0,00202 ± 0,00003
Nr. 12.	Globulin nicht eingeengt	0,00209 ± 0,00003
Nr. 12a.	Globulin eingeengt	0,00196 ± 0,00003
Nr. 12b.	Globulin zur Trockne eingeengt und wieder gelöst	0,00188 ± 0,00004

Bei Serum Nr. 9 ist also der spezifische Brechungszuwachs des eingetrockneten und wieder gelösten Globulins höher als der des eingeengten und liegt nahe dem nicht eingeengten.

Bei Serum Nr. 12 nimmt der spezifische Brechungszuwachs (wie fast allgemein) bei der eingeengten Lösung ab und liegt nach dem Eintrocknen und Wiederauflösen noch tiefer.

Ein Zusammenhang zwischen Konzentration und spezifischem Brechungszuwachs scheint auch nach diesen Ergebnissen nicht zu bestehen.

Schorer sowie *Rohrer* wiesen besonders auf die Bedeutung von Eintrocknungen und von vorangegangenen Temperaturschwankungen auf Eiweißlösungen hin und betonen die Veränderungen und Schwierigkeiten, welche sich daraus ergeben; *Schorer* zitiert eine Arbeit *Freys*, wonach es nicht möglich ist, bei kolloidalen Lösungen denselben Brechungsindex zu

erhalten, wenn diese vorher größeren Schwankungen der Temperatur, sei es positiver oder negativer Natur, ausgesetzt worden sind.

2. Wirkliche Unterschiede des spezifischen Brechungszuwachses.

Wenn man auch alle bisher besprochenen Fehler in Berücksichtigung zieht, so bleiben trotzdem noch Schwankungen übrig, die man als reelle Unterschiede bezeichnen könnte, weil sie sowohl untereinander als gegen den Mittelwert über den aus den einzelnen Proben ermittelten Bestimmungsfehler und vielleicht auch über den hier nur einmal ermittelten Darstellungsfehler hinausgehen.

Diese Aussage würde überzeugender klingen, wenn für alle Bestimmungen auf der Basis einer doppelten Darstellung auch der Darstellungsfehler beurteilt werden könnte. Es wäre auch interessant zu wissen, ob bei analogen Untersuchungen an Normalseren die Differenzen gleich groß oder kleiner ausfallen. *Auf Grund des vorliegenden Materials kann aber vorläufig noch nicht mit aller wünschenswerten Sicherheit ausgeschlossen werden, daß die gefundenen Unterschiede zur Gänze methodischer Natur sind, und es kann infolgedessen auch nicht mit Sicherheit behauptet werden, daß wirkliche Variationen des spezifischen Brechungszuwachses für Globulin und für Albumin bestehen,* noch weniger welche Größe ihnen zukommen kann. Doch kann gesagt werden, daß diese *Variationen keinesfalls sehr große sind,* denn die Extremwerte betrugen:

für isoliertes Globulin . . . . . 0,00206 und 0,00234,
für isoliertes Albumin . . . . . 0,00191 „ 0,00212

nach Ausscheiden von je einem aus der Reihe springenden Werte. Die durch Kombination des Bestimmungs- und Darstellungsfehlers mögliche Abweichung für Globulin derselben Ausgangslösung erhaltene Abweichung von 0,00206 — 0,00002 bis 0,00220 + 0,00002 legt mir in der Beurteilung der gefundenen Variationen vorläufig Zurückhaltung auf.

Zur Erklärung etwaiger wirklicher Verschiedenheiten des spezifischen Brechungszuwachses in verschiedenen Seren käme in Betracht eine chemische Verschiedenheit der einzelnen Eiweißfraktionen des Albumins und des Globulins, die ja selbst nicht einheitliche Körper darstellen, sondern sich wieder in Unterfraktionen von verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften zerlegen lassen. Eine Verschiebung des Prozentverhältnisses, in dem diese Unterfraktionen das Serumalbumin und das Serumglobulin zusammensetzen, könnte obige Schwankungen des spezifischen Brechungszuwachses des Albumins und des Globulins zur Folge haben, besonders dann, wenn eine der Unterfraktionen stärker in ihrem Lichtbrechungsvermögen von den anderen abweicht und so schon durch verhältnismäßig kleine Verschiebungen große Schwankungen im spezifischen Brechungszuwachs hervorrufen würde. Nach den bisherigen Ergebnissen in der Literatur, sowie nach den geringen Schwankungsbreiten des spezifischen Brechungszuwachses für Albumin und Globulin, welche sich aus vorliegender Arbeit ergeben, scheint dies jedoch nicht in größerem Umfange der Fall zu sein.

II. Die indirekte Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses für Albumin und Globulin aus dem Ammonsulfat-Eiweißgemisch (Bestimmung an den nicht isolierten Fraktionen).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden, wie eingangs erwähnt, auch dazu benutzt, dem an den isolierten Globulinen und Albuminen durch direkte Bestimmung erhaltenen spezifischen Brechungszuwächsen Vergleichswerte, die an den Albuminen und Globuminen des gleichen Serums durch indirekte Bestimmung erhalten wurden, gegenüberzustellen.

Ein solcher Vergleich ist insofern von Wert, als eben die in der Literatur vorliegenden und auseinandergehenden Werte mit verschiedenen Methoden gewonnen wurden und weil meines Wissens keine Angaben darüber vorliegen, wie verschieden die Resultate sein können, wenn direkte und indirekte Methoden am gleichen Serum angewendet werden.

Methodik.

Von verschiedenen Untersuchern wurden folgende, der Mikroeiweißanalyse nach *Robertson* angepaßte, im Prinzip ähnliche, in der Ausführung aber etwas abweichende Methoden angewendet.

1. *Starlinger* und *Hartl* haben im Filtrat des Gemisches Serum — halbgesättigte Ammonsulfatlösung ana partes neben der Eiweißrefraktion auch den Eiweißgehalt gravimetrisch bestimmt und daraus bei 23 Seren den spezifischen Brechungszuwachs für Albumin und unter Benutzung des ebenfalls nach ihrer Methode gravimetrisch bestimmten Gesamteiweißes und der nach *Robertson* ermittelten Gesamteiweißrefraktion den spezifischen Brechungszuwachs für Globulin ermittelt. Sie erhielten dabei bedeutend weiter gehendere Schwankungen, als sie selbst bei der Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses an gereinigten Fraktionen fanden, und die *weitesten Schwankungen*, über die in der Literatur überhaupt berichtet wird, nämlich für Albumin an 23 Seren Werte von *0,00108* bis *0,00291* um einen Mittelwert von 0,00187 (gegenüber 0,00137 bis 0,00204, Mittelwert 0,00166 (an sechs Dialysaten), für die Globuline an 20 Seren im Ammonsulfat-Serumgemisch *0,00126* bis *0,00493* (!) Mittelwert 0,00254 (gegenüber 0,00214 bis 0,00312, Mittelwert 0,00265 (an sieben Dialysaten).

2. *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* haben zum Zwecke einer vorläufigen Orientierung ebenfalls Bestimmungen an nicht isolierten Fraktionen vorgenommen und hierzu drei Wege eingeschlagen.

a) $\frac{\text{Albuminrefraktion berechnet aus dem Filtrat des 1:2 verdünnten Serums nach Halbsättigung mit } Am_2SO_4}{\text{Albumingewicht berechnet aus dem Filtrat des 1:6 verdünnten Serums}}$

Die Refraktion wurde direkt mit Prisma II in dem Filtrat des Ammonsulfat-Eiweißgemisches, das bei der *Robertson*schen Bestimmung erhalten wurde, bestimmt und der Eiweißgehalt durch Bestimmung des Eiweiß-N im Filtrat des Ammonsulfat-Eiweißgemisches, das bei der Bestimmung nach *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* erhalten wurde. Sie haben diese Rechnungsweise angewendet, weil dafür aus den Parallelanalysen nach *Robertson*

und nach *Petschacher, Berger* und *Schretter* das größte Zahlenmaterial zur Verfügung stand, obwohl sie diese Methode insofern nicht als ideal fanden, als, wie oben erwähnt, die Albuminmengen Differenzen zeigen, je nachdem die Untersuchung im 1 : 2 oder im 1 : 6 verdünnten Serum vorgenommen wird, so daß bei diesem Verfahren die Refraktion und der Eiweißgehalt nicht immer in völlig identischer Lösung bestimmt werden. (32 Untersuchungen an menschlichen und sieben Untersuchungen an Kaninchenseren.)

b) $\frac{\text{Albuminrefraktion im Filtrat des 1:6 verdünnten Serums nach Halbsättigung mit } Am_2SO_4}{\text{Albumingewicht im Filtrat des 1:6 verdünnten Serums}}$.

Um die bei a) begangenen Fehler auszuschalten, wurden beide Größen, also nicht nur das Gewicht, sondern auch die Refraktion des Eiweißanteils im Filtrat eines 1 : 6 verdünnten Serums ermittelt.

Ausführung: Bestimmung der Refraktion direkt mit Prisma II im gleichen Ammonsulfatgemisch, das für die Kjeldahlbestimmung verwendet wurde. Diese Methode ergab die schlechtesten Resultate, weil die Refraktionsbestimmung im Filtrat des 1 : 6 verdünnten Serums zu ungenau wird, und wurde daher fallen gelassen (17 Fälle).

c) $\frac{\text{Albuminrefraktion im Filtrat des 1:2 verdünnten Serums}}{\text{Albumingewicht im Filtrat des 1:2 verdünnten Serums}}$.

Ausführung. Der Eiweißgehalt wird aus der überstehenden Flüssigkeit, welche bei der Robertsonmethode zur Ermittlung des Albumingehalts verwendet wird, bestimmt; ebenso der Brechungsanteil für Eiweiß. Diese Methode umgeht den bei a) hervorgehobenen Fehler, bedingt aber einen Fehler, der dadurch hervorgerufen wird, daß die Fällungsgrenzen im 1 : 2 verdünnten Serum nicht so exakt sind, wie die im 1 : 6 verdünnten. Die Schwankungsbreite war bei dieser Methode größer als bei Methode a).

Mit diesen drei Methoden wurden von *Petschacher, Berger* und *Schretter* folgende Resultate erhalten:

	Mittelwert	Schwankungsbreite	Methode	Zahl der Fälle
Albumin . .	0,001 92	0,001 74—0,002 20	a	32 + 7
Globulin . .	0,002 05	0,001 71—0,002 25	a	32 + 7
Albumin . .	0,002 07	0,001 68—0,002 46	b	15
Globulin . .	0,002 11	0,001 76—0,002 34	c	16

In der vorliegenden Arbeit wurde zur indirekten Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses die erste Methode nach *Petschacher, Berger,* und *Schretter* angewendet.

Gegenüber der Bestimmung an den isolierten Albuminen und Globulinen wurde der indirekten Methode der Vorzug zugeschrieben, Eiweiß zu untersuchen, das den Prozeduren der Umfällung und Dialyse und den dadurch möglichen Veränderungen seiner Konstitution und seines spezifischen Brechungszuwachses nicht ausgesetzt wird (*Starlinger* und *Hartl*). Dagegen hat die genannte indirekte Methode gegenüber den Bestimmungen an den isolierten Fraktionen den Nachteil, daß die Gegenwart sämtlicher Nichteiweißstoffe und der hohen Kon-

zentration von Ammonsulfat das Meßresultat beeinflussen können, und daß der spezifische Brechungszuwachs für die Globuline nur indirekt bestimmt wird.

Diese Bewertung der direkten und indirekten Methode zur Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses ist zunächst eine rein theoretische und die Untersuchung mit beiden Methoden am gleichen Serum wird zeigen müssen, bei welcher Methode die Vorteile größer sind als die Nachteile. Es darf vielleicht angenommen werden, daß jene Methode die richtigere ist, welche die geringere Streuung und die bessere Übereinstimmung mit den beim Gesamteiweiß ermittelten Werten gibt.

Im allgemeinen ergeben sowohl die Untersuchungen von *Starlinger* und *Hartl* wie auch die von *Petschacher*, *Berger* und *Schretter*, *daß die Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses bei Gegenwart des fällenden Salzes bedeutend größere Schwankungen zeigen als die angeführten Bestimmungen an isolierten Fraktionen.*

Ergebnisse.

Zur Beurteilung der Resultate ist ebenfalls notwendig, vorerst die Fehlerbreite der Methode zu kennen, wobei wieder:

a) die aus der refraktometrischen Untersuchung,

b) die aus der Kjeldahlmethode erwachsenden Fehler zu berücksichtigen sind.

Die Fehler aus der Refraktionsbestimmung setzen sich zusammen aus dem Ablesefehler für die Restrefraktion (*a*), der mit 0,1 Skalenteile ($n_D = \pm 0{,}00002$) angenommen wurde; dem ebenso großen für die Vollserumrefraktion (*b*) und endlich dem jeweils durch Doppelanalysen zu bestimmenden Aussalzungs- und Ablesungsfehler für die Refraktion des Ammonsulfat-Serumgemischs (*c*).

Bezeichnet man diese Fehler der Reihe nach mit *a*, *b* und *c*, so ergibt die Berechnung folgende Abweichungen:

Für die *Albumine*: Die doppelte Differenz der Refraktionsablesung des mit Ammonsulfat halbgesättigten Serums (in n_D ausgedrückt), vermehrt um die doppelten für die Bestimmung der Restrefraktion angenommenen Fehler ($n_D = \pm 0{,}00004$); also $2\,(a + c)$.

Für die *Globuline*: Die doppelte Differenz der Refraktionsablesung des mit Ammonsulfat halbgesättigten Serums (in n_D ausgedrückt), vermehrt um den für die Refraktion des Vollserums angenommenen Fehler ($n_D = \pm 0{,}00002$) also $2\,a + b$.

Der Fehler aus der Kjeldahlbestimmung wird für Albumin jeweils aus dem maximalen und minimalen Wert des Thiosulfatverbrauchs berechnet: für das Globulin ist er aus den Extremwerten für Albumin und für Gesamteiweiß so zu berechnen, daß vom größten Gesamteiweißwert der kleinste Albuminwert abgezogen wird und umgekehrt.

Die Kombination des aus der refraktometrischen und der kjeldahlometrischen Untersuchung sich ergebenden Fehlers zeigt die größte, noch

methodisch erklärbare Schwankungsbreite für den spezifischen Brechungszuwachs an.

Die auf diese Weise ermittelte Fehlerbreite ist in den Tabellen jedem Resultat beigegeben.

Die Schwankung betrug:

im Mittel:	für Gobulin	± 0,00010,	für Albumin	± 0,00005
„ Maximum:	„ „	± 0,00023,	„ „	± 0,00019
„ Minimum:	„ „	± 0,00001,	„ „	± 0,00001

Für diese *indirekte* Methode der Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses ist demnach die *Fehlerbreite eine größere* als die für direkte Bestimmung aus den isolierten Fraktionen, oder für das Gesamteiweiß.

1. Spezifischer Brechungszuwachs für nicht isoliertes Albumin.

Die mit dieser indirekten Methode für *Albumin* sich ergebenden Werte mit der aus Doppelanalysen berechneten Fehlerbreite zeigt die folgende Tabelle III, in der zum Vergleich auch die am gleichen Serum für das isolierte Albumin direkt erhaltenen Werte wiederholt sind.

Tabelle III.

Spezifischer Brechungszuwachs für die nicht isolierten *Albumine* nach indirekter Bestimmungsmethode und Vergleich mit dem spezifischen Brechungszuwachs nach direkter Bestimmungsmethode.

Nr.	Bei indirekter Bestimmungsmethode			Bei direkter Bestimmungsmethode		
	Konz. g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz v. Mittelwert	Konz. g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz v. Mittelwert
3	4,46	0,002 05 ± 0,000 02	+ 0,000 09	3,90	0,002 12 ± 0,000 07	+ 0,000 12
4	4,71	0,001 85 ± 0,000 02	− 0,000 11	—	—	—
5	—	—	—	4,39	(0,002 75) ± 0,000 08	—
6	4,15	0,001 94 ± 0,000 06	− 0,000 02	3,94	0,001 92 ± 0,000 06	− 0,000 08
7	7,79	(0,001 56) ± 0,000 03	—			
8	3,74	0,002 03 ± 0,000 06	+ 0,000 07	1,62	0,002 12 ± 0,000 06	+ 0,000 12
9	4,46	0,001 81 ± 0,000 01	− 0,000 15	—	—	—
10	4,82	0,002 00 ± 0,000 08	+ 0,000 04	2,01	0,002 07 ± 0,000 06	+ 0,000 07
11, I	1,42	(0,002 29) ± 0,000 09	—	3,19	0,001 93 ± 0,000 08	− 0,000 07
11, II				2,41	0,001 96 ± 0,000 10	− 0,000 04
12	3,78	0,002 01 ± 0,000 02	+ 0,000 05	2,59	0,001 91 ± 0,000 04	− 0,000 09

Es ergibt sich daraus für den *spezifischen Brechungszuwachs des Albumins*:

1. Von acht untersuchten Seren und einer Ascitesflüssigkeit gaben bei indirekter Bestimmung im Ammonsulfat-Eiweißgemisch sieben für den spezifischen Brechungszuwachs Werte, die zwischen 0,001 81 und 0,002 05 um einen Mittelwert von 0,001 96 mit einer Schwankungsbreite von ± 0,000 12 sich bewegten. Der Mittelwert lag also hier etwas niedriger als bei Bestimmungen an den isolierten (nicht eingeengten) Albuminen, bei denen er 0,002 04 betrug.

2. Von acht untersuchten Seren und einer Ascitesflüssigkeit gaben bei indirekter Bestimmungsmethode zwei stark aus der Reihe fallende Werte, und zwar Nr. 7 einen abnorm niedrigen Wert von 0,00156, und die Ascitesflüssigkeit (Nr. 11) einen abnorm hohen Wert von 0,00229. Es dürften hier wohl Fehlbestimmungen vorliegen, denn die nach der Art der Bestimmung dazu reziproken Globulinwerte betrugen 0,00360 bzw. 0,00174. Sie waren also abnorm hoch, bzw. abnorm niedrig und wichen von dem an isolierten Albuminen bzw. Globulinen des gleichen Serums bzw. der Ascitesflüssigkeit direkt bestimmten spezifischen Brechungszuwachs stark ab (Nr. 7 Albumin 0,00192, Nr. 11 Albumin I. 0,00193, II. 0,00196.)

3. *Der Vergleich der Werte, die an den nicht isolierten Albuminen (indirekt) gewonnen wurden, mit den an den isolierten Albuminen (direkt) gewonnenen Fraktionen* zeigt, daß sich bei verschiedenen Methoden aus dem gleichen Serum für den spezifischen Brechungszuwachs (mit zwei Ausnahmen) Werte ergaben, die zwar etwas voneinander differierten ($\pm$ 0,00003$_5$, 0,00001, 0,00004$_5$, *0,00003$_5$*, *0,00018*, *0,00016$_5$*, *0,00005*), wobei aber die Berechnung der Fehlerbreite der beiden Verfahren ergibt, *daß diese Differenzen nicht groß sind und daß Differenzen in dieser Größe rein methodisch bedingt sein können.*

4. Die *Extremwerte und die Schwankungsbreite* des spezifischen Brechungszuwachses waren hier bei der *indirekten* Methode *nicht wesentlich größer* als bei der direkten Bestimmung an den isolierten Fraktionen, abgesehen von den zwei auszuscheidenden Fällen mit den ganz aus der Reihe springenden Werten.

2. Der spezifische Brechungszuwachs für nicht isoliertes Globulin.

Für die Globuline, deren indirekt ermittelte Werte weniger zuverlässig sind, da sie hier auf dem Wege der Differenzmethode ermittelt wurden, ergeben sich die Werte, welche die folgende Tabelle IV aufweist, wobei ebenfalls der Vergleich mit den indirekt erhaltenen Werten durchgeführt ist.

Es ergibt sich daraus für den *spezifischen Brechungszuwachs der Globuline*:

1. Bei sieben untersuchten Seren und einer Ascitesflüssigkeit lieferten sieben bei Bestimmung aus dem Ammonsulfat-Eiweißgemisch Globulinwerte, die zwischen *0,00195* und *0,00228* lagen und sich um einen *Mittelwert von 0,00216* in einer Schwankungsbreite von $\pm$ 0,00016 bewegten, die sich also durchschnittlich in ähnlichen Grenzen hielten wie die an den isolierten Fraktionen erhaltenen Werte. Der so gefundene Mittelwert stimmt sogar mit dem an den isolierten (nicht eingeengten) Fraktionen erhaltenen nahezu überein (0,00212 gegenüber 0,00219).

Tabelle IV.

Spezifischer Brechungszuwachs für die nicht isolierten *Globuline* nach indirekter Bestimmungsmethode und Vergleich mit dem spezifischen Brechungszuwachs nach direkter Bestimmungsmethode.

Nr.	Bei indirekter Bestimmungsmethode			Bei direkter Bestimmungsmethode		
	Konz. g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz v. Mittelwert	Konz. g-Proz.	Spez. Brechungszuwachs	Differenz v. Mittelwert
3	2,09	0,002 23 ± 0,000 12	+0,000 10	—	—	—
4	2,05	0,002 27 ± 0,000 05	+0,000 14	2,08	0,002 34 ± 0,000 03	+ 0,000 15
5	—	—	—	3,58	0,002 18 ± 0,000 04	− 0,000 01
6	2,92	0,001 99 ± 0,000 09	−0,000 14	4,41	0,002 33 ± 0,000 07	+ 0,000 14
7	1,68	(0,003 60) ± 0,000 16	—	3,69	0,002 28 ± 0,000 02	+ 0,000 09
8	1,86	0,001 95 ± 0,000 23	−0,000 18	—	—	—
9	2,98	0,002 28 ± 0,000 01	+0,000 15	3,51	0,002 08 ± 0,000 02	− 0,000 11
10	2,39	0,001 96 ± 0,000 12	−0,000 17	2,89	(0,002 70) ± 0,000 02	—
11, I	2,09	(0,001 74) ± 0,000 10	—	4,27	0,002 20 ± 0,000 02	+ 0,000 01
11, II				3,84	0,002 06 ± 0,000 02	− 0,000 13
12	1,65	0,002 20 ± 0,000 06	+0,000 07	2,69	0,002 09 ± 0,000 04	− 0,000 10

2. Von den untersuchten Seren und der Ascitesflüssigkeit gaben zwei stark abweichende Werte, nämlich Nr. 7 (0,00360) und Nr. 11 (0,001 74). Wie bei Besprechung der Albuminwerte betont, muß es sich hier um Fehlbestimmungen handeln, wobei über den Mechanismus derselben vorderhand nichts Bestimmtes ausgesagt werden soll.

3. Der Vergleich mit den Werten, die an isolierten Fraktionen gefunden wurden, ergibt folgende Differenzen, $\pm 0{,}00003_5$, 0,00017 ($0{,}00066_5$), 0,00010, (0,00037), 0,00023, 0,00016, $0{,}00005_5$.

Die Fälle Nr. 7 und 11, bei denen Fehler der indirekten Bestimmung, und der Fall Nr. 10, bei dem ein Fehler der direkten Bestimmung angenommen werden darf, kann ausgeschieden werden.

Die Differenz ist nur in einem Falle (Nr. 9) *größer als die Fehlerbreite* der direkten und indirekten Bestimmung.

Erwägt man weiter, daß den an der oberen Grenze gelegenen oder darüber hinausspringenden Werten der einen Methode nicht auch solche der anderen entsprechen, und daß dasselbe auch für die niedrigen Werte gilt, so liegt die Annahme nahe, daß Einflüsse der Methodik beim Zustandekommen dieser Differenz eine größere Rolle gespielt haben als reelle Schwankungen des spezifischen Brechungszuwachses.

4. Die Extremwerte und Schwankungsbreite dieser Methode waren hier nicht größer als die Extremwerte und Schwankungen, welche die direkte Bestimmung an isolierten Fraktionen ergibt, trotz der schon an anderer Stelle erörterten Unvollkommenheiten dieses Verfahrens und trotzdem das Globulin hier im Differenzverfahren ermittelt

wird. *Größere Schwankungen bei Doppelbestimmungen* kennzeichnen jedoch diese Werte im ganzen als weniger zuverlässig.

Die Gegenüberstellung der an gleichen Seren nach beiden Methoden erhaltenen Werte für Albumin und Globulin *ergibt im allgemeinen eine gute Übereinstimmung. Die Unterschiede gehen über die schon rein der Methode zuzuschreibende Schwankungsbreite von ± 0,00006 nur selten und nicht erheblich hinaus. Die Resultate der direkten Bestimmung erhalten dadurch eine Bestätigung.* Die indirekte Methode scheint zur Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses geeignet, doch mahnen Resultate, wie sie beim Pneumonieserum (Nr. 7) erhalten wurden, in welchem ein extremer, nicht nur von allen anderen Bestimmungen, sondern auch von der Bestimmung am isolierten Globulin desselben Serums weit abweichender Globulin- und ihm entsprechend ein ebenso aus der Reihe springender Albuminwert erhalten wurde, sowie die größere Schwankungsbreite der Globulinwerte zur Vorsicht und zu Kontrollen durch direkte Bestimmung.

Zusammenfassung.

1. Zustandekommen der differenten Werte für den spezifischen Brechungszuwachs.

In Untersuchungen über die für die Chemie des Serumeiweißes und für die Methodik der Eiweißanalyse des Serums bedeutsame Frage, *ob der spezifische Brechungszuwachs des Serumeiweißes als Ganzes* und seiner Hauptfraktionen, des *Serumalbumins* und des *Serumglobulins* in verschiedenen Seren derselbe ist, oder ob er *physiologischen und pathologischen Variationen* unterworfen ist, sind bei Beurteilung gefundener Abweichungen auseinanderzuhalten.

1. Methodisch bedingte Abweichungen.

2. Wirkliche Abweichungen, bedingt durch chemische und physikalische Unterschiede der untersuchten Eiweißlösungen.

a) Methodisch bedingte Abweichungen.

Auf diesen Punkt ist mehr Gewicht zu legen als bisher geschehen ist, denn die in der Literatur vorliegenden und die eigenen Untersuchungen über den spezifischen Brechungszuwachs ergeben, daß *im gleichen Serum mit verschiedenen Methoden verschiedene Resultate gewonnen werden*, ja daß sogar an einer eigenen Untersuchungsreihe an Albumin und Globulin aus einer Ascitesflüssigkeit *mit gleicher Methodik* die Werte für parallel isolierte Albumin- und Globulinlösungen nur innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite übereinstimmen. Es muß daher bei Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses mit rein

methodisch bedingten Schwankungen, deren Größe noch nicht hinreichend bestimmt ist, gerechnet werden. Es werden dabei auseinandergehalten: 1. Bestimmungsfehler, 2. Darstellungsfehler.

Bei der *indirekten Bestimmung* an den vom fällenden Salz nicht befreiten Eiweißlösungen kommen die etwaigen Einflüsse, welche die Nichteiweißkörper auf die Refraktionsbestimmung nehmen (Addition der Brechungsanteile der hitzekoagulablen Nichteiweißkörper zur Eiweißrefraktion und eventuell Beeinflussung der Eiweißrefraktion durch Beimengungen) in Betracht. Bei Doppelbestimmungen an derselben Eiweißlösung ist dieser Fehler derselbe.

Wegen dieser vielfältigen Beeinflussungsmöglichkeiten sind daher zur Beantwortung der aufgeworfenen Fragestellung Doppelanalysen besonders wünschenswert, und zwar sowohl:

1. Doppelbestimmungen des spezifischen Brechungszuwachses an der gleichen Eiweißlösung, sowie

2. doppelte Darstellung der zu untersuchenden Eiweißlösung aus einer Serumprobe.

Das letztere wurde vorläufig an einem Beispiel (Asciteseiweißkörper) durchgeführt mit dem Resultat, daß es *möglich ist*, durch den eingeschlagenen Weg der Isolierung und Reinigung Albumine und vielleicht auch Globuline darzustellen, deren spezifischer Brechungszuwachs praktisch identisch ist.

In den vorliegenden Untersuchungen beträgt die *Breite der methodisch bedingten Schwankungen* für den spezifischen Brechungszuwachs:

	Mittel	Minimal	Maximal
a) Bestimmungsfehler.			
Bei Gesamteiweiß	$\pm$ 0,000 02$_5$	$\pm$ 0,000 01	$\pm$ 0,000 06
„ isoliertem Albumin	$\pm$ 0,000 07	$\pm$ 0,000 04	$\pm$ 0,000 10
„ „ Globulin	$\pm$ 0,000 03	$\pm$ 0,000 02	$\pm$ 0,000 07
„ nicht isoliertem Albumin . .	$\pm$ 0,000 05$_5$	$\pm$ 0,000 01	$\pm$ 0,000 09
„ „ „ Globulin . .	$\pm$ 0,000 10$_5$	$\pm$ 0,000 01	$\pm$ 0,000 23
b) Darstellungsfehler.			
Bei Doppeldarstellung von isoliertem Albumin	$\pm$ 0,000 01	$\pm$ 0,000 04	
„ „ „ „ Globulin	$\pm$ 0,000 06$_5$	$\pm$ 0,000 02$_5$	

b) Wirkliche Unterschiede des spezifischen Brechungszuwachses.

Als solche können mit Sicherheit nur jene Abweichungen bezeichnet werden, die von den errechneten Mittelwerten, oder was noch überzeugender wäre, (bei Reihenuntersuchungen) am gleichen Kranken vom Ausgangswert um einen Betrag schwanken, der größer ist als die

methodisch ermittelte Schwankungsbreite. Solche Abweichungen wurden gefunden. Es ist aber vorläufig trotzdem nicht sicher auszuschließen, daß auch ein Teil dieser Schwankungen der Methodik zur Last falle.

Auf jeden Fall ist die Forderung zu erheben, daß *bei Untersuchungen über den spezifischen Brechungszuwachs stets die methodisch bedingte Schwankungsbreite untersucht und angegeben werde.*

2. Der spezifische Brechungszuwachs isolierter Albumine und Globuline.

Der spezifische Brechungszuwachs wurde an acht pathologischen Menschenseren und einer Ascitesflüssigkeit an *isolierten und durch dreimaliges Umfällen gereinigten* Albumin- und Globulinfraktionen *direkt* bestimmt.

Es ergaben sich als Mittelwerte des spezifischen Brechungszuwachses für:

isoliertes Serumglobulin	*0,00219*
isoliertes Serumalbumin	*0,00207*

Als Maximalwert für:

isoliertes Serumglobulin	0,00234
isoliertes Serumalbumin	0,00212

Als Minimalwert für:

isoliertes Serumglobulin	0,00206
isoliertes Serumalbumin	0,00191

Die Mittelwerte der isolierten Fraktionen *nähern sich in diesen Untersuchungen dem in der ersten Mitteilung angegebenen Wert für den spezifischen Brechungszuwachs des Gesamteiweißes von* **0,00200**.

Der spezifische Brechungszuwachs für isoliertes Globulin scheint nach den vorliegenden Untersuchungen größer zu sein, als der für isoliertes Albumin. Dies geht sowohl aus den Mittelwerten hervor, als auch aus dem Vergleich der Werte für Albumin und Globulin aus dem gleichen Serum. Denn im gleichen Serum hatte das isolierte Globulin mit einer Ausnahme (Serum 5), bei welchem für das isolierte Albumin ein aus der Reihe springender und wahrscheinlich fehlerhafter Wert von 0,00275 ermittelt wurde, stets einen höheren spezifischen Brechungszuwachs als das Albumin.

In verschiedenen Seren finden sich aber auch *Globuline, deren spezifischer Brechungszuwachs niedriger ist als der in anderen Seren für Albumin ermittelte Wert* und umgekehrt.

Die Schwankungsbreite des spezifischen Brechungszuwachses der isolierten Albumine und Globuline war nicht so groß wie *Starlinger* und *Hartl* angeben.

Ein Vergleich des spezifischen Brechungszuwachses des isolierten Albumins und isolierten Globulins mit dem des Gesamteiweißes im gleichen Serum liefert eine gewisse innere Kontrolle:

	Gesamteiweiß	Albumin	Globulin
Serum Nr. 6	0,001 96	0,001 92	0,002 24
„ Nr. 10	0,001 98	0,002 07	0,002 70 (?)
Ascites Nr. 11, I	0,001 96	0,001 93	0,002 19
„ Nr. 11, II	0,001 96	0,001 96	0,002 06
Serum Nr. 12	0,002 07	0,001 91	0,002 08

Von vier Seren mit derart vergleichbaren Werten lag also dreimal der Gesamteiweißwert zwischen den Werten für Albumin und Globulin; einmal jedoch lag er unter dem für Albumin ermittelten Wert (Serum Nr. 10), bei Ascites II waren beide Werte identisch.

Einzelne Autoren haben in der Beobachtung, daß sie für das Gesamteiweiß einen Wert erhielten, der mit den aus den Einzelwerten für Globulin und Albumin berechneten Werten nicht harmoniert, einen Beweis zu sehen vermeint, daß Albumin und Globulin sich nicht einfach, sondern unter gewissen Umsetzungen mischen. Ehe man dies jedoch annimmt, müßten aber methodische Fehler als Ursache solcher Resultate mit Sicherheit ausgeschlossen werden können und müßte auch mit Mischungsversuchen das gleiche Resultat erzielbar sein. In einem Falle sind beispielsweise für die isolierten Fraktionen jedenfalls auffallend hohe Werte erhalten worden. In diesem Serum ist gerade die normale Gesamteiweißrefraktion ein Grund, den Ursachen nachzugehen, welche zu den sonderbaren Befunden für die Fraktionen geführt haben.

Der Vergleich der für Gesamteiweiß und Albumin erhaltenen Mittelwerte zeigt, daß sie innerhalb der methodisch bestimmten Fehlerbreite als identisch bezeichnet werden können (Gesamteiweiß 0,00202, isoliertes, nicht eingeengtes Albumin 0,00200).

Auf jeden Fall geht hervor, daß das angewendete Isolierungsverfahren die Zusammensetzung der untersuchten Eiweißkörper, soweit sie im spezifischen Brechungszuwachs ihren Ausdruck finden, nicht wesentlich gegenüber der im nativen Serum, der durch die Refraktion des Gesamteiweißes charakterisiert wird, verändern muß.

Die hier bestimmten Werte nähern sich mehr einem Mittelwert von 0,00200, wie er sich uns aus einer großen Anzahl von Analysen menschlichen Blutserums bei den verschiedensten Krankheitszuständen und auch bei unveränderten Kaninchenseren für das Gesamteiweiß ergibt. Gegenüber den *Robertson*schen Zahlen, von denen mir die Anzahl der Bestimmungen, auf welche sie sich stützen, nicht bekannt ist, unterscheiden sie sich dadurch, daß ein Unterschied zwischen Albumin und Globulin aus der Gesamtheit der Bestimmungen zwar ebenfalls hervorgeht, daß er aber etwas verwischt ist und daß für Globulin zum Teil niedrigere Werte erhalten wurden als für Albumin, dies aber niemals im gleichen Serum, sondern nur bei Vergleich verschiedener Sera.

Bei dem großen Einfluß, den, wie hier dargelegt, die Methodik auf die Resultate nehmen kann, sind die in der Literatur vorliegenden und die hier vorgelegten Werte noch nicht als definitiv anzusehen.

In *methodischer Hinsicht* bestätigen diese Resultate gegenüber *Starlinger* und *Hartl* die Grundlagen der *Robertson*schen Methode und die Angaben von *Berger* und *Petschacher*, *Arnd* und *Hafner*, *Petschacher*, *Berger* und *Schretter* über die Brauchbarkeit der refraktometrischen Methode nach *Robertson*.

Es wäre jedoch immerhin zu überlegen, ob am *Robertson*schen Verfahren eine weitere Verbesserung zu erzielen wäre, etwa in der Form, daß das Gesamteiweiß direkt unter Zugrundelegung des aus eigenen und anderen Untersuchungen sich ergebenden Mittelwertes des spezifischen Brechungszuwachses für Gesamteiweiß von 0,00200 und ebenso das Albumin berechnet wird und daß dann das Globulin durch Subtraktion des Albumins vom Gesamteiweiß erhalten wird.

In *allgemein chemischer Hinsicht* ergibt sich, daß der Beweis größerer Veränderungen der Albumine und Globuline in pathologischen Seren auf refraktometrischem Wege nicht beigebracht werden konnte; es ist noch unentschieden, wieweit gefundene Differenzen durch die Methodik vorgetäuscht werden und in welchem Ausmaß ihnen wirkliche Schwankungen der Eiweißzusammensetzung zugrunde liegen. *Die relative Konstanz der spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes muß jedenfalls vor weitergehenden Schlüssen in dieser Hinsicht warnen.*

3. Der spezifische Brechungszuwachs nicht isolierter Albumine und Globuline.

Die Bestimmung des spezifischen Brechungszuwachses an nicht isoliertem Albumin und Globulin bestätigt im allgemeinen die Ergebnisse der Bestimmung an den isolierten Fraktionen. Es wurden dabei folgende Werte erhalten:

für nicht isoliertes Albumin 0,00181 — *0,00196* — 0,00205,
für nicht isoliertes Globulin 0,00195 — *0,00213* — 0,00228.

Die Differenz zwischen den Werten der isolierten und der nicht isolierten Fraktionen des gleichen Serums gingen über die im einzelnen Falle ermittelte Fehlerbreite der beiderseitigen Mittelwerte nur selten und nicht bedeutend hinaus. Für die Unterschiede der Fraktionen aus verschiedenen Seren gilt das über den spezifischen Brechungszuwachs der isolierten Fraktionen Gesagte. Gewisse Erfahrungen mahnen jedoch zur Vorsicht in der Verwertung der indirekten Methode.

4.

Zum Schluß sollen die in der vorliegenden Untersuchung erhaltenen Werte mit den Angaben anderer Untersucher zusammengestellt werden.

a) Spezifischer Brechungszuwachs des Albumins.

Die Angaben, welche in der Literatur vorliegen, sind in Tabelle V mit den eigenen Werten zusammengestellt:

Tabelle V.

Der spezifische Brechungszuwachs für *Albumin* bei verschiedenen Autoren.

Mittelwert	Schwankungsbreite	Autoren	Zahl der Fälle
	a) Bestimmungen an isolierten Fraktionen.		
—	0,001 83—0,002 01	*Reiss*	?
0,001 77	0,001 73—0,001 80	*Rohrer*	12 (davon 2 von Menschen)
0,001 77	?	*Robertson*	?
0,001 88	0,001 75—0,001 98	*Schorer*	6
0,001 66	0,001 37—0,002 04	*Starlinger* u. *Hartl*	6
0,002 00	0,001 91—0,002 12	*Schretter*	8
	b) Bestimmungen an nicht isolierten Fraktionen.		
0,001 87	0,001 08—0,002 91	*Starlinger* u. *Hartl*	20
0,001 92	0,001 74—0,002 20	*Petschacher*, *Berger* u. *Schretter*	32 pathol. Menschensera
0,001 79	0,001 72—0,001 98	Dieselben	7 norm. Kaninchensera
0,001 96	0,001 81—0,002 05	*Schretter*	9

Folgende Werte stehen sich untereinander und dem Werte für das Gesamteiweiß sehr nahe:

0,002 00 für isoliertes Albumin, *Schretter*;
0,001 96 für nicht isoliertes Albumin, *Schretter*;
0,001 92 für nicht isoliertes Albumin, *Petschacher*, *Berger* und *Schretter*;
0,001 88 für isoliertes Albumin, *Schorer*.

Den niedrigsten Mittelwert nennen *Starlinger* und *Hartl* mit 0,001 66. Jedoch bestehen gegen die Bestimmungsmethode Bedenken. Warum *Rohrer* und *Robertson* einen so niederen Wert erhalten (0,001 77), ist nicht recht ersichtlich. (Vgl. das in der ersten Mitteilung beim spezifischen Brechungszuwachs des Gesamteiweißes hierüber Gesagte.)

b) Spezifischer Brechungszuwachs des Globulins.

Die Literaturangaben und die eigenen Werte finden sich in Tabelle VI:

Tabelle VI.

Spezifischer Brechungszuwachs für *Globulin* bei verschiedenen Autoren.

Mittelwert	Schwankungsbreite	Autoren	Zahl der Fälle
	a) Bestimmungen an isolierten Fraktionen.		
—	0,002 24—0,002 30	*Reiss*	?
0,001 77	0,001 72—0,001 80	*Rohrer*	11 (davon 2 von Menschen)
0,002 29	?	*Robertson*	?
0,002 45	0,002 30—0,002 70	*Schorer*	6
0,002 65	0,002 14—0,003 12	*Starlinger* u. *Hartl*	7
0,002 19	0,002 06—0,002 34	*Schretter*	9
	b) Bestimmungen an nicht isolierten Fraktionen.		
0,002 54	0,001 26—0,004 93	*Starlinger* u. *Hartl*	23
0,002 05	0,001 71—0,002 25	*Petschacher*, *Berger* u. *Schretter*	32 pathol. Menschen
0,002 09	0,001 84—0,002 26	Dieselben	7 norm. Kaninchen
0,002 13	0,001 95—0,002 28	*Schretter*	9

Am nächsten kommen sich untereinander und dem Werte für das Gesamteiweiß:

0,002 29 für isoliertes Globulin, *Robertson*;
0,002 19 für isoliertes Globulin, *Schretter*;
0,002 13 für nicht isoliertes Globulin, *Schretter*;
0,002 05 für nicht isoliertes Globulin, *Petschacher*, *Berger* und *Schretter*.

Bei den vorliegenden Untersuchungen hat mich Fräulein *Else Schnellrieder*, wissenschaftliche Hilfskraft der Klinik, in sehr dankenswerter Weise unterstützt.

Literatur.

Arnd und *Hafner*, diese Zeitschr. **167**, 440, 1926. — *Berger* und *Galehr*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. (im Druck). — *Berger* und *Petschacher*, ebendaselbst **86**, 258, 1923. — *Jensen-Hansen*, Abderhaldens Handb., Abt. I, Teil 8, S. 601. — *Kessler*, ebendaselbst, Abt. II, Teil 2, Heft 1, S. 817. — *Neuhausen* und *Rioch*, Journ. of biol. Chem. **55**, 353, 1923. — *Osborne* und *Strauss*, Abderhaldens Handb., Abt. I, Teil 8, S. 383. — *Petschacher*, *Berger* und *Schretter*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **50**, 449, 1926. — *Reiss*, Hofmeisters Beitr. **4**, 150, 1904. — *Derselbe*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **10**, 531, 1916. — *Derselbe*, Abderhaldens Handb., Abt. II, Teil 2, Heft 1, S. 817. — *Robertson*, Journ. of biol. Chem. **11**, 179, 1912; **22**, 223, 1923. — *Rohrer*, Schweizer med. Wochenschr. **22**, 1922. — *Rona* und *Takahashi*, diese Zeitschr. **49**, 370, 1913. — *Samuely* und *Strauss*, Abderhaldens Handb., Abt. I. Teil 8, S. 461. — *Schorer*, Korrespondenzbl. f. Schweizer Ärzte **43**, 1523, 1913. — *Schulz*, Abderhaldens Handb., Abt. I, Teil 8, S. 455. — *Starlinger* und *Hartl*, diese Zeitschr. **160**, 113, 1925ff.

Die Doppelbestimmung als Genauigkeitsmaß bei quantitativen Analysen.

Von

Alfred Fleisch.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 12. August 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Mit dem Beitritt der Biologie zu den exakten Wissenschaften tritt die Forderung nach hoher Präzision ihrer quantitativen Untersuchungsmethoden immer mehr hervor. Die Verfeinerung der Methodik wird demgemäß auch allseitig angestrebt, aber merkwürdigerweise unterbleibt meistens eine brauchbare Angabe über die Fehlergröße der Methode. Und doch ist die Kenntnis des mittleren Versuchsfehlers sehr häufig unentbehrlich für die Entscheidung, ob Schwankungen der Versuchsresultate lediglich im Bereich der methodischen Fehler liegen, oder ob diese Schwankungen durch einen *äußeren Einfluß* bedingt sind. Es muß deshalb auch für die biologischen Wissenschaften zur Gewohnheit werden, bei der Beschreibung einer quantitativen Methode den mittleren Versuchsfehler anzugeben.

Die Bestimmung der *Dispersion* (= mittlerer Fehler) nach den Methoden der Fehlerrechnung ist relativ einfach, wenn zahlreiche Messungen an einer wohl unbekannten aber konstanten Größe vorgenommen werden. Diesbezügliche Beispiele sind: die häufig wiederholte Messung ein und derselben Strecke, oder die häufig wiederholte Zuckerbestimmung an *ein und derselben* Traubenzuckerlösung. Solche einfache Fälle sind nun aber in der Biologie die Ausnahme, indem meistens die zu bestimmende Größe nicht konstant ist, sondern fort-

während variiert. Wenn z. B. Blutzuckerbestimmungen in Serien ausgeführt werden, so ändert sich der Blutzuckergehalt derselben Person im Verlauf des Tages, und jede Person hat einen etwas verschiedenen Blutzuckerspiegel. In diesem Falle mit fortwährend variabler Unbekannten kann, wenn nur Einzelbestimmungen ausgeführt werden, nichts über die Genauigkeit der Methode ausgesagt werden. Der mittlere Fehler der Methode kann aber eruiert werden, wenn *Doppelbestimmungen* vorliegen, von denen vorausgesetzt werden kann, daß der wahre Wert der Unbekannten für die beiden Doppelbestimmungen derselbe ist. Darin liegt ein großer Vorteil der Doppelbestimmungen. Der andere Vorteil besteht darin, daß der mittlere Fehler des arithmetischen Mittels aus den zwei Bestimmungen kleiner ist, und zwar $\sqrt{2}$ mal kleiner ist als der mittlere Fehler der Einzelbestimmungen. Aus diesem letzteren Grunde hauptsächlich hat sich die Doppelbestimmung bei quantitativen Messungen schon stark eingebürgert.

Im folgenden soll ein Weg gezeigt werden, wie auf Grund der Doppelbestimmung der mittlere Fehler der Methode eruierbar ist, obwohl der wahre Wert der Unbekannten für jede Doppelbestimmung ein anderer ist. Als Beispiel wähle ich 442 Doppelbestimmungen des Blutfettes, die ich nach der Methode von *Bang* an Kaninchenblut ausgeführt habe anläßlich Untersuchungen über die hormonale Beeinflussung des Blutfettspiegels. Wesentlich zu erwähnen ist, daß die zwei Blutentnahmen für die Doppelbestimmung möglichst rasch nacheinander und unter möglichst den gleichen Bedingungen erfolgten, so daß den beiden Blutproben sehr angenähert der gleiche Blutfettgehalt zugrunde liegt.

Die fehlerrechnerische Behandlung dieses Materials geschieht nach der Methode der *qualitativen Statistik*. Doch sei schon hier hervorgehoben, daß zwischen unserem Material und den Fällen, für welche die Methode der qualitativen Statistik geschaffen ist, eine Wesensverschiedenheit existiert. Die qualitative Statistik ist nämlich den Fällen angepaßt, bei welchen eine größere Zahl von Messungen von einer einzigen, wohl unbekannten, aber konstanten Größe vorliegen; ein diesbezügliches Beispiel ist die häufig wiederholte Messung ein und derselben Strecke oder die häufige Bestimmung des Blutfettes an ein und demselben Blute. Unsere Doppelbestimmungen beziehen sich hingegen auf Blut, das für jede Doppelbestimmung einen anderen Fettgehalt aufweist, und nur den beiden Einzelanalysen einer Doppelbestimmung liegt derselbe Fettgehalt zugrunde. Mit dem obigen Beispiel in Beziehung gesetzt, handelt es sich also in unserem Falle um 442 Doppelmessungen von 442 verschieden langen Strecken, deren wahre Längen unbekannt sind. Trotzdem muß sich aber aus der Zahl und der Größe

der aus den Doppelbestimmungen resultierenden Differenzen ein Rückschluß ziehen lassen auf die Genauigkeit der Fettanalyse; denn es ist selbstverständlich, daß die gefundenen Differenzen der Doppelbestimmungen um so kleiner ausfallen müssen, je präziser die Fettanalyse ist.

Von den Abweichungen, die infolge der nicht ganz angepaßten Behandlungsmethode nach Art der qualitativen Statistik entstehen, wird später die Rede sein.

Die Behandlung nach Art der qualitativen Statistik geschieht entsprechend den Ausführungen von *Fueter*[1]).

Das erste Ziel ist die *Berechnung der Dispersion* σ (= mittlerer Fehler), indem die Größe der Dispersion das Genauigkeitsmaß der einzelnen Fettanalyse darstellt. Die Dispersion σ ist

$$\sigma = \sqrt{\frac{[x^2]}{n}},$$

wobei $([x^2])$ die Summe der Fehlerquadrate und n die Anzahl der Messungen bedeutet. Jedoch sind die wirklichen Fehler $x_1, x_2 \ldots x_n$ unbekannt, da man den wahren Wert der Unbekannten niemals kennt. Anstatt des wahren Wertes der Unbekannten wird deshalb der *ausgeglichene Wert* gesetzt, der gleich dem arithmetischen Mittel der einzelnen Messungen ist; und an Stelle der wahren Fehler werden die *scheinbaren Fehler* gesetzt, die den Differenzen zwischen Messungsresultaten und ausgeglichenem Wert entsprechen.

In Abweichung von der üblichen Fehlerrechnung haben wir für unsere Versuchsserie nicht nur einen einzigen ausgeglichenen Wert, sondern jede Doppelbestimmung besitzt ihren eigenen ausgeglichenen Wert, der gleich dem arithmetischen Mittel der beiden Bestimmungen ist. Da die scheinbaren Fehler gleich der Differenz zwischen den beiden Bestimmungen und ihrem arithmetischen Mittel sind, so tritt jeder scheinbare Fehler zweimal in gleicher Größe, aber mit verschiedenem Vorzeichen auf.

Da es sich um eine große Versuchsserie handelt, so wäre die Bildung der Summe der Fehlerquadrate sehr umständlich, weshalb folgende vereinfachte Methode angewendet wird (siehe *Fueter*, S. 248):

Sämtliche scheinbaren Fehler der ganzen Versuchsserie werden ihrer Größe nach in Klassen von der Breite w eingeteilt. Die Breite w wird hier zweckmäßig zu 2 ($= 2 \cdot 10^{-6}$ g Fett) gewählt. Jeder Klasse wird eine Nummer x zugeordnet. Die Klasse mit den Fehlern — 1 bis + 1 (Millionstel Gramm Fett) erhält die Nummer 0, die folgenden Klassen nach oben werden mit den Nummern 1, 2 usw., die Klassen nach unten mit den Nummern —1, — 2 usw. belegt. Die Anzahl der Fehler in jeder Klasse x werden abgezählt und mit $f(x)$ bezeichnet.

Die Statistik in dieser Form aufgeschrieben sieht für unsere Versuchsserie entsprechend der Tabelle I aus:

---

[1]) *Rudolf Fueter*, Das mathematische Werkzeug des Chemikers, Biologen und Statistikers. Zürich 1926 bei Orell Füssli.

Tabelle I.

Klasse	x	$f(x)$	$x^2 \cdot f(x)$	X	Y
15 bis 17	8	1	64	4,4	0,01
13 „ 15	7	5	245	3,85	0,05
11 „ 13	6	1	36	3,3	0,01
9 „ 11	5	6	150	2,75	0,06
7 „ 9	4	10	160	2,2	0,10
5 „ 7	3	31	279	1,65	0,32
3 „ 5	2	90	360	1,1	0,93
1 „ 3	1	169	169	0,55	1,74
1 „ − 1	0	258	0	0	2,66
− 1 „ − 3	− 1	169	169	− 0,55	1,74
− 3 „ − 5	− 2	90	360	− 1,1	0,93
− 5 „ − 7	− 3	31	279	− 1,65	0,32
− 7 „ − 9	− 4	10	160	− 2,2	0,10
− 9 „ −11	− 5	6	150	− 2,75	0,06
−11 „ −13	− 6	1	36	− 3,3	0,01
−13 „ −15	− 7	5	245	− 3,85	0,05
−15 „ −17	− 8	1	64	− 4,4	0,01
	Summe $n = 884$		2926 $= \Sigma x^2 f(x)$		

Bei dieser Berechnungsart ergibt sich für die Dispersion[1]) σ_{unk}:

$$\sigma^2_{unk} = \frac{w^2}{n} \Sigma x^2 f(x) - b^2,$$

wobei w die Breite der einzelnen Klassen, n die Gesamtzahl der Messungen bzw. der Fehler, x die Nummer und $f(x)$ die Anzahl der Fehler in der betreffenden Klasse bedeuten. b ist ein Korrekturglied, das in unserem Falle Null wird. Nach Tabelle I ergibt sich für $\Sigma x^2 f(x)$ 2926, so daß $\sigma^2_{unk} = 13{,}24$ und

$$\underline{\sigma_{unk} = 3{,}64}$$

wird.

Wenn die Versuchsreihe einwandfrei ist, so müssen nach dem *Bernoulli*schen Gesetz rund zwei Drittel der Fehler absolut kleiner als die Dispersion σ_{unk} sein. Da die drei mittleren Klassen mit Fehlern von — 3 bis + 3 allein schon 67,5 Proz. der Fälle enthalten, so ist in dieser Beziehung nichts gegen die Versuchsreihe einzuwenden.

Ein weiteres Mittel der Prüfung besitzen wir in der *Konstruktion der Fehlerkurve*, die, wenn die Statistik einwandfrei ist, mit der *Gauß*schen Fehlerkurve übereinstimmen muß.

Die *Gauß*sche Fehlerfunktion hat die Gestalt:

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\,\sigma} e^{-\frac{X^2}{2\sigma^2}},$$

[1]) Diese unkorrigierte Dispersion wird als σ_{unk} bezeichnet im Gegensatz zu den später erscheinenden korrigierten Dispersionen.

wobei X die Abszisse, y die Ordinate und σ die Dispersion bedeutet. Um von dem jeweiligen σ unabhängig zu sein, wurde die *Gauß*sche Fehlerkurve ein für allemal konstruiert (Abb. 1) nach der Gleichung

$$Y = 2\,e^{-\frac{X^2}{2}},$$

die erhalten wird, wenn in die *Gauß*sche Fehlerfunktion folgende neue Koordinaten eingeführt werden:

$$X = \frac{x}{\sigma}; \qquad Y = 2\sqrt{2\pi}\,\sigma\,y = \text{rund } 5\,\sigma\,y.$$

Für jede Nummer x der Tabelle I werden die zugehörigen Abszissen und Ordinaten berechnet nach den Formeln (siehe *Fueter*, S. 252):

$$X = \frac{w\,x}{\sigma_{\text{unk}}}; \qquad Y = \frac{5\,\sigma_{\text{unk}}}{w\,n}\,f(x).$$

Die so berechneten Werte für X und Y sind in Tabelle I wiedergegeben. In Abb. 1 sind die Werte als Punkte aufgetragen und durch gestrichelte Linien miteinander verbunden. Die ausgezogene Linie stellt die *Gauß*sche Fehlerkurve dar.

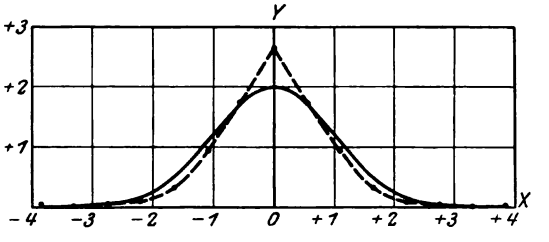


Abb. 1.

Ausgezogene Linie gleich *Gauß*sche Fehlerkurve. Die durch gestrichelte Linien verbundenen Punkte repräsentieren die Fehlerkurve der Versuchsserie.

Die Fehlerkurve unserer Versuchsserie stimmt nun durchaus nicht mit der *Gauß*schen Fehlerkurve überein, indem die gestrichelte Kurve beim Abszissenpunkt 0 einen stark positiven Exzeß aufweist, dem andererseits ein negativer Exzeß der Abszissenpunkte 1,1 und 1,65 gegenübersteht. Vom Standpunkt der mathematischen Wahrscheinlichkeitsrechnung aus ist somit die Statistik nicht einwandfrei. Durch einen äußeren Einfluß wurden relativ zu viel günstige Fälle, d. h. zu viel Fälle mit kleinem Fehler geschaffen.

Dieser Exzeß scheint in erster Linie durch die mathematische Behandlung nach Art der qualitativen Statistik verursacht zu sein, indem diese Behandlungsart unserer Versuchsserie nicht ganz angepaßt ist, wie oben ausgeführt wurde. Dadurch, daß für jede Doppelbestimmung das arithmetische Mittel als ausgeglichener Wert genommen wird, entsteht nämlich ein systematischer Fehler. Wenn auch dem arithmetischen Mittel als dem ausgeglichenen Wert die größte Wahrscheinlichkeit zukommt, mit dem unbekannten wahren Wert zu koinzidieren, so wird doch eine solche Koinzidenz nur in einem Teil der Fälle vorhanden sein. Im anderen Teil der Fälle weicht der wahre Wert vom ausgeglichenen Wert ab, und dann sind die wahren Fehler größer als die von uns verwendeten scheinbaren Fehler.

Eine Illustration hierzu bildet das Schema von Abb. 2, in dem die vertikalen Strecken die Fehlergrößen bedeuten.

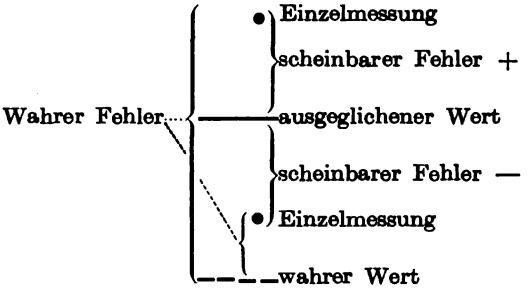


Abb. 2.

Aus dem Falle von Abb. 2 ist klar ersichtlich, daß anstatt eines großen und eines kleinen wahren Fehlers durch die Verwendung des ausgeglichenen Wertes zwei kleine scheinbare Fehler in die Statistik eingesetzt werden. Besonders auffällig ist diese Fälschung, wenn die zwei Einzelmessungen koinzidieren, so daß die beiden scheinbaren Fehler Null sind. Wenn dabei der wahre Wert, was zweifellos vorkommt, von den koinzidierenden zwei Einzelmessungen nach oben oder unten abweicht, so werden die gemachten wahren Fehler ignoriert und als scheinbare Fehler von der Größe Null in die Stastistik eingesetzt.

Die Verwendung des arithmetischen Mittels als ausgeglichener Wert erzeugt somit folgende systematische Fälschung:

1. Es werden künstlich relativ zu viel günstige Fälle, d. h. Fälle mit kleinem Fehler in die Statistik eingesetzt.

2. Die wahren Fehler müssen im Durchschnitt offensichtlich größer sein als die in die Statistik eingesetzten scheinbaren Fehler. Folglich ist auch die oben berechnete Dispersion $\sigma_{unk} = 3{,}64$ offensichtlich zu klein.

Wenn hingegen, wie dies gewöhnlich der Fall ist, eine große Zahl von Einzelmessungen einer wohl unbekannten aber konstanten Größe nach Art der qualitativen Statistik behandelt wird, so tritt die genannte Fälschung nicht auf, da in diesem Falle der ausgeglichene Wert wegen der großen Zahl der Einzelmessungen sehr angenähert mit dem wahren Wert der unbekannten Größe übereinstimmt.

Um auch in unserem Falle der Doppelbestimmungen von einer unbekannten variablen Größe die wahre Dispersion zu erfahren, erscheint es zweckmäßig, eine *Korrektur* einzuführen.

Vernünftigerweise sollte die Korrektur darin bestehen, als ausgeglichenen Wert nicht mehr das arithmetische Mittel der beiden Einzelbestimmungen zu verwenden, sondern den wahren Wert der Unbekannten selbst bzw. einen diesem sehr nahe kommenden Wert. Doch kennen wir den wahren Wert der Unbekannten, welcher einer Doppelbestimmung zugrunde liegt, nicht. Hingegen erscheint die Supposition vernünftig, daß in Summa sämtlicher Doppelbestimmungen das arithmetische Mittel eine gesetzmäßige Streuung um den jeweiligen wahren Wert der Unbekannten ausführt. Für

die Größe dieser Streuung hätten wir einen Anhaltspunkt in der wahren Dispersion σ der Einzelbestimmung. Die Dispersion eines arithmetischen Mittels von n Einzelbestimmungen ist $\sqrt{n}$mal kleiner als die Dispersion der Einzelgröße. Die Dispersion unseres arithmetischen Mittels σ_m ist somit:

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}.$$

Nun kennen wir aber die wahre Dispersion σ der Einzelbestimmung noch nicht, sondern σ soll erst durch die Korrektur ermittelt werden. Wir können nun so vorgehen, daß wir anstatt σ die zu kleine unkorrigierte Dispersion $\sigma_{unk} = 3{,}64$ setzen und damit eine erste Korrektur durchführen, die, wenn auch noch nicht die wahre Dispersion σ, so doch einen besseren Wert als σ_{unk} ergeben muß. Wir setzen deshalb

$$\sigma_m = \frac{\sigma_{unk}}{\sqrt{n}} = \frac{3{,}64}{\sqrt{2}} = 2{,}58.$$

Über die Art der Streuung des arithmetischen Mittels um den wahren Wert der Unbekannten können wir die Annahme machen, daß sie, wenn nicht vollständig, so doch angenähert, der *Gauß*schen Fehlerfunktion entspricht.

Das Prinzip unserer Korrektur besteht also darin, daß als ausgeglichener Wert nicht mehr das arithmetische Mittel genommen wird, sondern ein neuer ***korrigierter, ausgeglichener Wert***, der sich mit der Dispersion σ_m entsprechend der *Gauß*schen Fehlerfunktion um das arithmetische Mittel gruppiert. Unter Verwendung dieses korrigierten ausgeglichenen Wertes werden neue, nämlich die ***korrigierten scheinbaren Fehler*** berechnet, die im Durchschnitt größer ausfallen als die alten scheinbaren Fehler.

Die praktische Durchführung dieser etwas zeitraubenden Korrektur sei kurz angedeutet:

1. Die unter Verwendung des arithmetischen Mittels als ausgeglichener Wert gefundenen scheinbaren Fehler werden in neue Klassen von geringerer Breite, nämlich $w = 0{,}5$, eingeteilt. In jeder Klasse wird die Anzahl der Fälle $f(x)$ abgezählt.

2. Durch Analyse der *Gauß*schen Fehlerfunktion wurde folgende quantitative Beziehung zwischen Prozentsatz der Fälle und Streuungsintensität gefunden:

Tabelle II.

Für	15,92	Proz.	der	Fälle	beträgt	die	Streuung	$0{,}1 \cdot \sigma$
„	15,28	„	„	„	„	„	„	$0{,}298 \cdot \sigma$
„	14,08	„	„	„	„	„	„	$0{,}498 \cdot \sigma$
„	12,48	„	„	„	„	„	„	$0{,}696 \cdot \sigma$
„	10,64	„	„	„	„	„	„	$0{,}896 \cdot \sigma$
„	12,52	„	„	„	„	„	„	$1{,}138 \cdot \sigma$
„	8,32	„	„	„	„	„	„	$1{,}435 \cdot \sigma$
„	6,20	„	„	„	„	„	„	$1{,}764 \cdot \sigma$
„	4.56	„	„	„	„	„	„	$2{,}30 \cdot \sigma$
	100,00	Proz.						

3. In jeder der unter 1. genannten Klassen der Breite $w = 0{,}5$ wird in 15,92 Proz. der Fälle dieser Klasse der ausgeglichene Wert um $0{,}1\,\sigma$ einmal nach oben und einmal nach unten vom arithmetischen Mittel weg verschoben und in bezug auf diesen korrigierten ausgeglichenen Wert die korrigierten scheinbaren Fehler berechnet. Der gleiche Prozeß wird wiederholt, indem in jeder Klasse in 15,28 Proz. der Fälle dieser Klasse der ausgeglichene Wert um $0{,}298\,\sigma$ verschoben wird, usw.

Nach Durchführung der ganzen Korrektur werden die korrigierten scheinbaren Fehler wieder in Klassen von der Breite $w = 2$ aufgeteilt und abgezählt, wieviel Fälle $f(x)$ in jede Klasse zu liegen kommen. Es resultiert eine Statistik analog derjenigen in Tabelle I, nur mit dem Unterschied, daß die Klassen mit kleinem Fehler (speziell Klasse $x = 0$) weniger Fälle und dafür die Klassen mit größeren Fehlern mehr Fälle erhalten haben.

Aus dieser korrigierten Statistik wird nun, in gleicher Weise wie für die Statistik in Tabelle I, die Dispersion berechnet, die, weil auf Grund einer ersten Korrektur erhalten, als σ_{k_1} bezeichnet sei. σ_{k_1} beträgt 4,44, ist also wesentlich größer als die unkorrigierte Dispersion $\sigma_{unk} = 3{,}64$.

Es ist zweifellos, daß σ_{k_1} der wahren Dispersion der einzelnen Fettbestimmung näher kommt als σ_{unk}. Aber auch σ_{k_1} muß noch als zu klein bewertet werden, weil wir der Streuung unseres Mittelwertes die zu kleine unkorrigierte Dispersion σ_{unk} zugrunde gelegt haben. Es muß deshalb die Korrektur in genau gleicher Weise nochmals gemacht werden, nur mit dem Unterschied, daß die Streuung des Mittelwertes nicht aus σ_{unk}, sondern aus der dem wahren Wert näher kommenden korrigierten Dispersion σ_{k_1} berechnet wird.

Die aus der zweiten Korrektur resultierende Dispersion σ_{k_2} beträgt 4,71.

Wenn in gleicher Weise σ_{k_2} für die Berechnung der Streuung des ausgeglichenen Wertes verwendet wird und damit die Korrektur ausgeführt wird, so resultiert $\sigma_{k_3} = 4{,}85$.

Durch dieses Näherungsverfahren mit wiederholten Korrekturen wird die resultierende korrigierte Dispersion immer mehr der gesuchten wahren Dispersion genähert, indem für die Streuung des ausgeglichenen Wertes mit jeder folgenden Korrektur ein der wahren Dispersion näher kommendes σ_k zugrunde gelegt werden kann. Tatsächlich werden die Zuwüchse der durch wiederholte Korrekturen erzielten σ_k fortwährend kleiner. Wenn die durch die sukzessiven Korrekturen erhaltenen Dispersionen als Abszisse und die jeweils erfolgten Zuwüchse als Ordinaten aufgetragen werden, so kann durch Extrapolation bestimmt werden, bei welcher Dispersion durch eine Korrektur kein Zuwachs

der Dispersion mehr erfolgen würde. Diese Extrapolation ergibt eine Dispersion σ von etwa 5,1.

Eine solche Extrapolation der wahren Dispersion ist natürlich nur angängig, wenn die Korrekturen zu große und zu kleine der Korrektur zugrunde gelegte Dispersionen gegen unseren extrapolierten wahren Wert der Dispersion konvergieren lassen. Dies ist auch tatsächlich der Fall. Wenn die Korrektur nämlich auf Grund einer willkürlich zu groß gewählten Dispersion $\sigma = 5{,}65$ durchgeführt wird, so resultiert eine kleinere korrigierte Dispersion von $\sigma_{k_4} = 5{,}39$.

Wenn hingegen die extrapolierte Dispersion von 5,1 für die Korrektur verwendet wird, so resultiert eine korrigierte Dispersion von wiederum 5,1. Die Korrektur hat somit keinen Einfluß mehr und wir dürfen *$\sigma = 5{,}1$ als die wahre Dispersion der einzelnen Fettbestimmung bezeichnen.* Tabelle III gibt eine Zusammenstellung der verschiedenen Dispersionen, die der Korrektur zugrunde gelegt wurden, und der daraus resultierenden Dispersionen.

Tabelle III.

Der Korrektur zugrunde gelegte Dispersion		Durch die Korrektur erhaltene Dispersion	Änderung der Dispersion durch die Korrektur
σ_{unk}	$= 3{,}64$	$\sigma_{k_1} = 4{,}44$	$+ 0{,}80$
σ_{k_1}	$= 4{,}44$	$\sigma_{k_2} = 4{,}71$	$+ 0{,}27$
σ_{k_2}	$= 4{,}71$	$\sigma_{k_3} = 4{,}85$	$+ 0{,}14$
$\sigma_{(extrapoliert)}$	$= 5{,}1$	$\sigma = 5{,}1$	$\pm 0{,}00$
$\sigma_{(willkürlich\ zu\ groß)}$	$= 5{,}65$	$\sigma_{k_4} = 5{,}39$	$- 0{,}26$

Da $\sigma = 5{,}1$ als die wahre Dispersion der einzelnen Fettbestimmung anzuerkennen ist, so sei diese Statistik aufgeschrieben, die resultiert, wenn der Korrektur $\sigma = 5{,}1$ zugrunde gelegt wird. Die Dispersion des ausgeglichenen Wertes um das arithmetische Mittel der beiden Einzelbestimmungen beträgt dann $5{,}1/\sqrt{2}$. Nach Durchführung der Korrektur werden Klassen von der Breite $w = 2$ gebildet, jeder Klasse eine Nummer x zugeordnet und abgezählt, wieviel Fälle $f(x)$ in jede Klasse zu liegen kommen (siehe Tabelle IV).

In einer einwandfreien Statistik müssen rund zwei Drittel der Fälle innerhalb der Dispersion liegen. Diese Forderung ist in der Statistik von Tabelle IV erfüllt, indem die Klassen mit der Nummer $x = 2$ bis $x = -2$ rund 70 Proz. der Fälle enthalten.

Die aus der Statistik von Tabelle IV resultierende Fehlerkurve ist in Abb. 3 wiedergegeben; die zahlenmäßigen Koordinaten finden sich in Tabelle IV in den Kolonnen X und Y.

Die berechnete Fehlerkurve steht ebenfalls in guter Übereinstimmung mit der *Gauß*schen Kurve, so daß auch in dieser Beziehung nichts gegen die Statistik eingewendet werden kann.

Auf eine eigenartige Beziehung, welche ich bei dieser Gelegenheit beobachtete, ist noch hinzuweisen. Die aus der Statistik von Tabelle I

Tabelle IV.

Klasse	x	$f(x)$	$x^2(fx)$	X	Y
23 bis 25	12	0,05	7	4,71	0,0007
21 „ 23	11	0,15	18	4,32	0,002
19 „ 21	10	0,36	36	3,92	0,005
17 „ 19	9	0,92	75	3,53	0,01
15 „ 17	8	1,82	116	3,14	0,03
13 „ 15	7	3,80	186	2,75	0,05
11 „ 13	6	6,95	250	2,36	0,10
9 „ 11	5	18,30	458	1,96	0,26
7 „ 9	4	36,80	589	1,57	0,53
5 „ 7	3	66,20	596	1,17	0,96
3 „ 5	2	102,85	411	0,78	1,48
1 „ 3	1	133,30	133	0,39	1,93
1 „ − 1	0	141,00	0	0	2,04
− 1 „ − 3	− 1	133,30	133	− 0,39	1,93
− 3 „ − 5	− 2	102,85	411	− 0,78	1,48
⋮ ⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
−23 −25	−12	0,05	7	− 4,71	0,0007
	$n = 884$		$5750 = \Sigma x^2 f(x)$		

$$\sigma^2 = \frac{w^2}{n} \cdot \Sigma x^2 f(x) = 26{,}02; \quad \underline{\sigma = 5{,}1.}$$

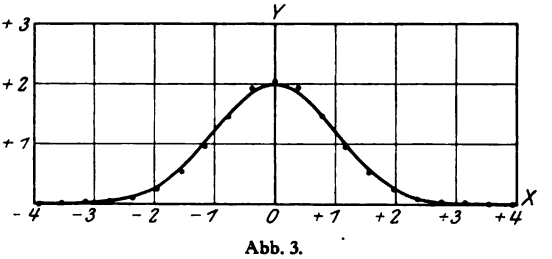


Abb. 3.

Die schwarzen Punkte bedeuten die aus der Statistik von Tabelle IV resultierende Fehlkurve. Die ausgezogene Linie ist die theoretische *Gauß*sche Fehlerkurve.

berechnete, noch vollständig unkorrigierte Dispersion beträgt $\sigma_{unk} = 3{,}64$. Durch die Korrekturen wurde als die wahre Dispersion der Einzelanalyse erhalten $\sigma = 5{,}1$. Das ist sehr angenähert das $\sqrt{2}$fache von 3,64. Wir haben für diese Versuchsserie somit die Beziehung $\sigma_{unk} \cdot \sqrt{2} = \sigma$, wobei σ die wahre Dispersion der Einzelanalyse bedeutet. Da die Dispersion eines arithmetischen Mittels aus zwei Bestimmungen $\sigma_m = \sigma/\sqrt{2}$ ist, so folgt, daß in unserer Versuchsserie die unkorrigierte Dispersion σ_{unk} gleich der wahren Dispersion des arithmetischen Mittels einer Doppelbestimmung ist:

$$\underline{\sigma_{unk} = \frac{\sigma}{\sqrt{2}} = \sigma_m.}$$

Dieser interessanten und für die Durchführung der Dispersionsberechnung von Doppelbestimmungen wichtigen Beziehung scheint all-

gemeinere Gültigkeit zuzukommen. So habe ich an einem anderen statistischen Material, das ebenfalls aus Doppelbestimmungen besteht, die Richtigkeit dieser Beziehung $\sigma_{unk} \cdot \sqrt{2} = \sigma$ bestätigt gefunden.

Herr Prof. Dr. *R. Fueter*, Ordinarius für Mathematik an der Universität Zürich, dem ich die vorliegenden Berechnungen und die gefundene Beziehung unterbreitete, hatte die Liebenswürdigkeit, die Richtigkeit dieser Beziehung in allgemeinerer Form herzuleiten, wofür ich ihm meinen besten Dank ausspreche. Diese Ableitung von Prof. *Fueter* lautet:

„Es wird angenommen, σ sei die *gesuchte wahre* Dispersion aller Beobachtungen. Wir setzen zunächst voraus, daß ein solches σ existiere. Dann ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein in einer Beobachtung gemachter Fehler X zwischen X und $X + dX$ liegt:

$$p = y dX, \text{ wo } y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\,\sigma} e^{-\frac{X^2}{2\sigma^2}}.$$

Nehmen wir an, die *wahren* Fehler einer Doppelbestimmung seien X_1 und X_2, so ist die Differenz $X_2 - X_1$ sicherlich $f(x)$mal als $\pm 2wx$ gefunden worden. Wir dürfen also:

$$X_1 = X + wx,\ X_2 = X - wx,\ dX = w$$

setzen. Die Wahrscheinlichkeit, den Fehler X_1 oder X_2 zu machen, ist somit:

$$p_1 = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\,\sigma} \cdot e^{-\frac{(X+wx)^2}{2\sigma^2}} \cdot dX, \quad p_2 = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\,\sigma} \cdot e^{-\frac{(X-wx)^2}{2\sigma^2}} \cdot dX,$$

und die Wahrscheinlichkeit, bei einer Doppelbeobachtung gerade X_1 und X_2 zu machen, ist (Undsatz):

$$p = 2p_1 \cdot p_2 = \frac{1}{\pi\sigma^2} \cdot e^{-\frac{X^2 + w^2x^2}{\sigma^2}} \cdot dX,\ dX = w.$$

Die Wahrscheinlichkeit, überhaupt in einer Doppelbestimmung zwei Fehler mit der Differenz $\pm 2wx$ zu machen, ist daher (Odersatz):

$$P = \int_{-\infty}^{+\infty} 2p_1 \cdot p_2 = \frac{dX}{\pi\sigma^2} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{X^2 + w^2x^2}{\sigma^2}} \cdot dX = \underline{\frac{1}{\sqrt{\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{w^2x^2}{\sigma^2}} \cdot w,\ w = dX.}$$

Andererseits ist empirisch unter n Doppelversuchen $f(x)$mal die Differenz der Fehler $\pm 2wx$, also die empirische Wahrscheinlichkeit für das Eintreffen:

$$\frac{f(x)}{nw} w.$$

Somit ist σ so zu bestimmen, daß für jedes x möglichst angenähert die Beziehung gilt:

$$\frac{1}{\sqrt{\pi}\,\sigma} \cdot e^{-\frac{w^2x^2}{\sigma^2}} \sim \frac{f(x)}{nw},$$

oder wenn man $\sigma = \sqrt{2} \cdot \sigma_1$ setzt:

$$\frac{1}{\sqrt{2\pi}\,\sigma_1} \cdot e^{-\frac{w^2x^2}{2\sigma_1^2}} \sim \frac{f(x)}{nw}, \quad x = 0, \pm 1, \pm 2, \ldots$$

Nun gibt aber gerade das oben berechnete $\sigma_{unk} = 3{,}64$ das angenähert beste σ_1 dafür, daß diese Gleichungen möglichst gut stimmen. Also ist in der Tat $\sigma = \sqrt{2} \cdot \sigma_1 = \sqrt{2}\,\sigma_{unk}$. Dies ist der theoretische Wert, wenn durch ein σ alle Beobachtungen der Versuchsreihe charakterisiert werden können.

Ob unsere Annahme, daß die Versuchsreihe durch *ein* σ charakterisiert werden kann, widerspruchsfrei ist, läßt sich, da wir σ jetzt kennen, folgendermaßen feststellen. Die Wahrscheinlichkeit, daß bei einer Doppelbestimmung der *wahre* Fehler $w(t + x)$ und $w(t - x)$ ist, ist nach obigem:

$$p = \frac{1}{\pi \sigma^2} e^{-\frac{(t^2 + x^2) w^2}{\sigma^2}} \cdot w^2.$$

Somit ist die Wahrscheinlichkeit, daß eine der $f(x)$-Doppelbestimmungen die wahren Fehler $w(t + x)$ und $w(t - x)$ besitzt:

$$\frac{p}{P} = \frac{1}{\sqrt{\pi}\,\sigma} e^{-\frac{t^2 w^2}{\sigma^2}} \cdot w.$$

Somit sind angenähert

$$\frac{f(x)}{\sqrt{\pi}\,\sigma} \cdot e^{-\frac{t^2 w^2}{\sigma^2}} \cdot w$$

derselben mit dem Fehler $w(t + x)$ bzw. $w(t - x)$ behaftet. So viele muß man also in die Klasse der Nummer $t + x$ und $t - x$ tun. Setzt man $u = t + x$, so erhält man für die Anzahl $F(u)$, wie oft wahrscheinlich der Fehler u in der Beobachtungsreihe einzusetzen ist [korrigierte $f(x)$]:

$$F(u) = w \sum_{x=-\infty}^{+\infty} \frac{f(x)}{\sqrt{\pi}\,\sigma} \cdot e^{-\frac{w^2 (u-x)^2}{\sigma^2}} \cdot u$$

Auf Grund dieser Korrektionsformel habe ich die Korrektur ausgeführt, indem $\sigma = \sqrt{2} \cdot \sigma_{unk} = 5{,}14$ angenommen wurde. Für die Variablen x und $f(x)$ dienen die unkorrigierten Werte der Tabelle I. Die Korrektur ergibt folgende Statistik:

Tabelle V.

u	$F(u)$	$u^2 F(u)$
0	145,8	0
± 1	133,1	133,1
± 2	101,4	405,6
± 3	65,1	585,9
± 4	35,9	574,4
± 5	17,6	440,0
± 6	8,2	295,2
± 7	4,0	196,0
± 8	2,08	133,1
± 9	1,05	85,0
±10	0,46	46,0
±11	0,16	19,3
±12	0,05	7,2
	$n = 884$	$5841 = \Sigma u^2 F(u)$

$$\sigma^2 = \frac{w^2}{n} \Sigma u^2 \cdot F(u) = 26{,}44; \quad \underline{\sigma = 5{,}14.}$$

Die korrigierte Statistik von Tabelle V, die sehr gut mit der von Tabelle IV übereinstimmt, ergibt eine *wahre* Dispersion von $\sigma = 5{,}14$. Die Tatsache, daß diese aus der korrigierten Reihe von Tabelle V berechnete Dispersion mit der geforderten Dispersion $\sigma = \sqrt{2} \cdot \sigma_{unk} = 5{,}14$ übereinstimmt, beweist die Widerspruchslosigkeit der oben gemachten Voraussetzung, daß alle Beobachtungen der Versuchsreihe durch ein σ charakterisiert werden können.

Auch die auf Grund der Statistik von Tabelle V berechnete Fehlerkurve deckt sich mit der von Abb. 3 fast vollständig; die Fehlerkurve ist also ebenfalls einwandfrei.

Die *Resultate* sind somit:

Die Dispersion der Einzelbestimmung beträgt $\sigma = 5{,}14$ ($= 5{,}14 \cdot 10^{-6}$ g Fett). Damit ist die Genauigkeit der Methode charakterisiert.

Die verwendete Beobachtungsreihe ist vom Standpunkt der mathematischen Wahrscheinlichkeitsrechnung aus einwandfrei, d. h. die gemachten Fehler sind alle zufälliger Natur und gruppieren sich in ihrer Zahl und Größe gesetzmäßig um den Fehler Null.

Die Beobachtungsreihe hat keinen systematischen Fehler. Als solche hätten z. B. zu gelten: verschiedene Genauigkeiten zu verschiedenen Zeiten, sei es, daß die zu verschiedenen Zeiten bezogenen und verwendeten Reagenzien die Genauigkeit beeinflußt hätten, oder daß das Blut des einen Tieres genauere Resultate liefert als das des anderen. Auch die Tatsache, daß die Beobachtungsreihe von drei verschiedenen Untersuchern herrührt und die Beobachtungsreihe trotzdem einwandfrei ist, beweist, daß die Genauigkeit der drei Untersucher annähernd dieselbe war.

Bei Versuchsserien mit Doppelbestimmungen von einer unbekannten variablen Größe läßt sich, sofern die Versuchsreihe den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit entspricht, die Dispersion der Einzelbestimmung auf dem dargelegten Wege berechnen, wobei die gefundene Beziehung $\sigma_{unk} \cdot \sqrt{2} = \sigma$ (σ = die gesuchte *wahre* Dispersion der Einzelbestimmung) dazu verhilft, die Berechnung einfach zu gestalten.

Zusammenfassung.

Zur Charakterisierung einer quantitativen Methode und zur Interpretierung der damit gewonnenen Resultate ist die Berechnung des mittleren Fehlers (= Dispersion) nach den Methoden der Fehlerrechnung notwendig. Währenddem die Berechnung der Dispersion bei Versuchsreihen mit zahlreichen Messungen einer wohl unbekannten aber konstanten Größe relativ einfach ist, bieten sich Kompliziertheiten bei Versuchsreihen, bei denen die gemessene Größe variabel ist (z. B. Blutzuckergehalt, Blutfettgehalt usw.). Es wird ein Weg gezeigt, um auch in diesem Falle die Dispersion zu berechnen, sofern die Versuchsreihe aus Doppelbestimmungen besteht. Die Behandlung geschieht nach Art der qualitativen Statistik, indem die Differenzen zwischen je zwei Einzelbestimmungen und ihrem arithmetischen Mittel als scheinbare Fehler in die Statistik eingesetzt werden. Die aus dieser

Statistik berechnete Dispersion σ_{unk} bedarf einer Korrektur, die durch ein Näherungsverfahren bestimmt wird. Soweit sich bislang beurteilen läßt, scheint der Korrekturfaktor eine Konstante zu sein und $\sqrt{2}$ zu betragen. Die *wahre* Dispersion der Einzelbestimmung σ beträgt demnach

$$\sigma = \sqrt{2} \cdot \sigma_{unk}.$$

Es wird eine Korrekturformel angegeben (S. 386), mittels der die Statistik umgerechnet und neu aufgestellt werden kann, um den notwendigen Nachweis zu erbringen, daß eine vorliegende Versuchsreihe den Gesetzen der mathematischen Wahrscheinlichkeit entspricht, oder ob systematische Fehler oder äußere Einflüsse die Beobachtungsreihe beeinflußt haben.

Über die Pufferung in homogenen und heterogenen Systemen.

Von

Kurt Täufel und **Carl Wagner.**

(Aus dem Laboratorium für angewandte Chemie an der Universität München.)

(Eingegangen am 13. August 1926.)

1. Bisherige Untersuchungen.

Gelegentlich einer Untersuchung über die Bedeutung und die Ermittlung der potentiellen Acidität[1]) ergab sich, daß für kompliziert zusammengesetzte Systeme, wie sie vor allem in der physiologischen Chemie, in der Lebensmittelchemie usw. eine Rolle spielen, neben der aktuellen Acidität, d. h. der Wasserstoffionenkonzentration bzw. dem Wasserstoffexponenten p_H, die *Pufferungskapazität* zur Charakterisierung der Aciditätsverhältnisse von wesentlicher Bedeutung ist. Die Pufferungskapazität stellt ein Maß für die Veränderlichkeit der Wasserstoffionenkonzentration dar. Sie ist definiert als diejenige Menge Lauge in Äquivalenten, die erforderlich ist, um den Wasserstoffexponenten p_H von 1 Liter des Systems um eine Einheit zu erhöhen bzw. als der entsprechende Differentialquotient.

Praktisch wird die Pufferungskapazität am einfachsten aus der Titrationskurve abgeleitet. Diese erhält man dadurch, daß man in einem rechtwinkligen Koordinatensystem als Ordinate den Wasserstoffexponenten p_H und als Abszisse die zu 1 Liter der Lösung zugegebene Menge starker Lauge (positive Richtung) bzw. starker Säure (negative Richtung) in Äquivalenten aufträgt[2]). Vielfach trägt man auf der Abszisse auch unmittelbar die Anzahl Kubikzentimeter der zugesetzten Titrierflüssigkeit auf; um auf Äquivalente umzurechnen, braucht man nur mit der Normalität der Titrierflüssigkeit zu multiplizieren und durch das Volumen der zu titrierenden Lösung (in Kubikzentimetern)

---

[1]) *K. Täufel* und *C. Wagner*, Zeitschr. f. angew. Chem., erscheint demnächst.

[2]) Das Volumen der Lösungen soll durch den Zusatz der Lauge bzw. Säure praktisch nicht verändert werden.

zu dividieren. Die Pufferungskapazität ist gleich der Cotangente des Neigungswinkels der Titrationskurve gegen die Abszissenachse, sofern für Abszisse und Ordinate der gleiche Maßstab gewählt ist, was jedoch im allgemeinen wegen der Übersichtlichkeit wenig zweckmäßig ist.

Theoretische Untersuchungen über die Abhängigkeit der Pufferungskapazität von der Zusammensetzung der Lösung sind vor allem von *L. J. Henderson*[1]), von *M. Koppel* und *K. Spiro*[2]), von *L. Michaelis*[3]) sowie von *D. D. van Slyke*[4]) durchgeführt worden. Derartige Untersuchungen haben Bedeutung für die rationelle Herstellung von Lösungen mit definierter Wasserstoffionenkonzentration (Pufferlösungen) sowie für die Beurteilung des Verhaltens von praktisch wichtigen Systemen gegenüber reaktionsändernden Einflüssen. Es sei hingewiesen auf die Bildung oder das Verschwinden von Säure bei enzymatischen Prozessen, z. B. beim Bierbrauen, bei der Gärung des Brotteiges, bei der Hefezucht, beim „Säureabbau" des Weines, bei den Vorgängen im pflanzlichen und tierischen Organismus.

Gibt man zu einer Lösung starke Säure, d. h. Wasserstoffionen, so nimmt im allgemeinen die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung nicht um den entsprechenden Betrag zu, da das in die Lösung gebrachte Wasserstoffion sich mit den in der Lösung vorhandenen Wasserstoffion-aufnehmenden Stoffen (Basen, Anionen schwacher Säuren) ins Gleichgewicht setzt. Diese Erscheinung wird als Pufferung bezeichnet.

Der einfachste Fall eines puffernden Systems ist gegeben durch das Gemisch einer schwachen Säure HA (Dissoziationskonstante K) mit einem ihrer Alkalisalze. Nach dem Massenwirkungsgesetz[5]) gilt sodann:

$$[\mathrm{H}^{\cdot}] = \frac{[HA]}{[A']} \cdot K \tag{1}$$

Sofern die Wasserstoffionenkonzentration (und Hydroxylionenkonzentration) klein ist gegenüber den Konzentrationen von Säure und Salz, kann mit großer Annäherung die Konzentration der nicht dissoziierten Säure $[HA]$ gleich dem Gehalt an titrierbarer Säure und die Anionenkonzentration $[A']$ gleich der Konzentration des Salzes gesetzt werden. Für die Veränderung des Wasserstoffexponenten p_{H} durch Zusatz der in dem Gemisch vorhandenen Säure ($[A']$ also konstant) folgt durch Differenzieren von (1):

$$\frac{\partial p_{\mathrm{H}}}{\partial [HA]} = -0{,}4343 \cdot \frac{1}{[HA]} \tag{2a}$$

[1]) Ergebn. d. Physiol. 8, 254, 1909; Amer. Journ. Physiol. **21**, 169, 1908.

[2]) Diese Zeitschr. **65**, 409, 1914.

[3]) Die Wasserstoffionenkonzentration I, 2. Aufl. S. 89. Berlin 1922.

[4]) Journ. biol. Chem. **52**, 525, 1922; vgl. auch *J. M. Kolthoff*, Der Gebrauch der Farbenindikatoren, 2. Aufl., S. 23. Berlin 1923.

[5]) In dieser Arbeit werden die sogenannten starken Elektrolyte gemäß den neueren theoretischen Vorstellungen als praktisch vollständig dissoziiert angesehen. Von der Einführung von Abweichungskoeffizienten, der sogenannten Aktivitätskoeffizienten, zur Berücksichtigung der durch die interionischen Kräfte bedingten Effekte ist zur Vereinfachung der Formeln Abstand genommen worden.

Für die Veränderung des Wasserstoffexponenten p_H durch Zusatz des in dem Gemisch vorhandenen Salzes ($[HA]$ also konstant) folgt durch Differenzieren von (1) die Gleichung:

$$\frac{\partial p_H}{\partial [A']} = 0{,}4343 \cdot \frac{1}{[A']}. \tag{2b}$$

Auf Zusatz von starken Basen (dB) erfolgt als Reaktion:

$$HA + OH' = A' + H_2O.$$

Infolgedessen ist $d[HA] = -dB$ und $d[A'] = dB$.

Auf Zusatz von starken Säuren (dS) findet umgekehrt die Reaktion statt:

$$A' + H' = HA,$$

d. h. $d[HA] = dS$ und $d[A'] = -dS$. In beiden Fällen bleibt $[HA] + [A'] = c$ konstant. Sodann erhält man:

$$\frac{dp_H}{dB} = -\frac{dp_H}{dS} = -\frac{\partial p_H}{\partial [HA]} + \frac{\partial p_H}{\partial [A']} = 0{,}4343\left(\frac{1}{[HA]} + \frac{1}{[A']}\right). \tag{3}$$

Die Größe $\frac{dp_H}{dB}$ ist von *L. Michaelis* als *Nachgiebigkeit* des Systems bezeichnet worden. Nimmt man den reziproken Wert, so erhält man die als *Pufferungskapazität* π definierte Größe:

$$\pi = \frac{dB}{dp_H} = 2{,}30\frac{[HA]\cdot[A']}{[HA]+[A']}. \tag{4}$$

Betrachtet man nur die Summe $c = [HA] + [A']$ sowie die Dissoziationskonstante und die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung als gegeben, so ist auf Grund von (1):

$$[HA] = \frac{c}{1 + \frac{K}{[H']}}, \tag{5a}$$

$$[A'] = \frac{c}{1 + \frac{[H']}{K}} \tag{5b}$$

und Gleichung (4) geht in die von *D. D. van Slyke* angegebene Form über:

$$\pi = 2{,}30 \cdot c \cdot \frac{[H']\cdot K}{([H'] + K)^2}. \tag{6}$$

Bei konstanter Gesamtkonzentration c erreicht die Pufferungskapazität π ein Maximum für $[H'] = K$ (optimale Pufferwirkung bei äquivalenten Mengen von Säure und Salz). Umgekehrt ist für $[H'] \ll K$ bzw. $[H'] \gg K$ die Pufferwirkung nur gering.

Analoge Betrachtungen lassen sich für die Gemische von schwachen Basen mit ihren Salzen (Gesamtkonzentration c') anstellen. Wird die Basendissoziationskonstante mit K' und das Ionenprodukt des Wassers mit K_w bezeichnet, so ergibt sich:

$$\pi = 2{,}30 \cdot c' \cdot \frac{[H']\cdot\frac{K_w}{K'}}{\left([H'] + \frac{K_w}{K'}\right)^2}. \tag{7}$$

Der Quotient $\frac{K_w}{K'}$ (gleich der Hydrolysekonstante des Basenkations) tritt an Stelle der Säuredissoziationskonstante in Gleichung (6).

M. Koppel und *K. Spiro* sowie *D. D. van Slyke* haben gezeigt, daß die Pufferungskapazität eines beliebig komplizierten Systems (Gemisch von mehreren Säuren und Basen) gleich der Summe der Pufferungskapazitäten der einzelnen Gleichgewichte ist. Falls die Wasserstoffionenkonzentration bzw. Hydroxylionenkonzentration nicht mehr vernachlässigt werden kann, wie in den vorstehenden Betrachtungen angenommen wurde, tritt noch ein Glied $2{,}30\,.\,([H^{\cdot}] + [OH'])$ bzw. $2{,}30\,.\left([H^{\cdot}] + \frac{K_w}{[H^{\cdot}]}\right)$ hinzu. Die allgemeine Gleichung lautet sodann:

$$\pi = 2{,}30\left\{[H^{\cdot}] + \frac{K_w}{[H^{\cdot}]} + \sum_i \frac{c_i\,.\,[H^{\cdot}]\,.\,K}{([H^{\cdot}] + K)^2} + \sum_j \frac{c_j' \cdot [H^{\cdot}] \cdot \frac{K_w}{K_j'}}{\left([H^{\cdot}] + \frac{K_w}{K_j'}\right)^2}\right\} \tag{8}$$

2. Die Pufferungskapazität heterogener Systeme.

Die bisherigen Überlegungen beschränken sich auf *homogene* Systeme. In der Praxis spielen jedoch vielfach auch *heterogene* Systeme eine Rolle, z. B. bei der Bodenacidität, beim Wein (Weinstein als Bodenkörper). Als einfachstes Beispiel betrachten wir zunächst ein System, bestehend aus einer *schwachen Säure als Bodenkörper und einem ihrer Alkalisalze in Lösung* (Konzentration des Salzes = Konzentration des Anions $= [A']$). Das Gleichgewicht ist nicht nur durch die Dissoziationskonstante K, sondern auch durch die Löslichkeit der Säure bestimmt.

Nach einem Ansatz von *W. Nernst* ist die Konzentration der nicht dissoziierten Säure in allen gesättigten Lösungen die gleiche; sie sei mit l_0 bezeichnet. Für die Wasserstoffionenkonzentration gilt sodann:

$$[H^{\cdot}] = \frac{l_0\,.\,K}{[A']}. \tag{9}$$

Durch Zusatz von starken Basen oder Säuren wird lediglich $[A']$ verändert, so lange noch Bodenkörper vorhanden ist. Der chemische Vorgang wird durch folgende Gleichungen ausgedrückt:

$$HA_{\text{fest}} + OH' = A' + H_2O \qquad \text{bzw.} \qquad A' + H^{\cdot} = HA_{\text{fest}}.$$

Für die Nachgiebigkeit des Systems gelten somit die Beziehungen[1]):

$$\left(\frac{d\,p_H}{d\,B}\right)_{HA} = -\left(\frac{d\,p_H}{d\,S}\right)_{HA} = \frac{\partial p_H}{\partial [A']} = 0{,}4343 \cdot \frac{1}{[A']}. \tag{10}$$

Für die Pufferungskapazität folgt daraus:

$$\pi_{HA} = 2{,}30\,.\,[A']. \tag{11}$$

[1]) In den folgenden Gleichungen sind diejenigen Stoffe, die als Bodenkörper vorhanden sind und deren Konzentration in der Lösung somit konstant ist, jeweils der Nachgiebigkeit bzw. Pufferungskapazität als Index beigefügt.

Im homogenen System gelten dagegen die schon besprochenen Gleichungen (3) und (4). Der Unterschied im Verhalten des homogenen und heterogenen Systems wird am klarsten durch einen Vergleich der Ausdrücke (3) und (10) für die Nachgiebigkeit. Im Falle des heterogenen Systems wird auf Zugabe von Lauge eine äquivalente Menge des Bodenkörpers aufgelöst, d. h. das System verhält sich so, als ob das Alkalisalz der betreffenden Säure an Stelle von Lauge zugefügt würde (vgl. Gleichung 2b). Umgekehrt ist der Zusatz von starker Säure gleichbedeutend mit einer Entfernung des Salzes der puffernden Säure.

Ein Vergleich der Ausdrücke (3) und (10) zeigt ferner, daß die Nachgiebigkeit des homogenen Systems größer als die des heterogenen Systems ist, da in Gleichung (3) gegenüber Gleichung (10) noch ein additives Glied $0{,}4343 \cdot \frac{1}{[HA]}$ hinzukommt. Dieses wird vor allem dann ins Gewicht fallen, wenn $[HA]$ klein gegen $[A']$ ist, d. h. besonders dann, wenn die Säure verhältnismäßig schwer löslich ist. Umgekehrt ist die Pufferungskapazität des heterogenen Systems größer als die des homogenen Systems. Ist $[HA] \ll [A']$, so ergibt sich für die Pufferungskapazität des homogenen Systems näherungsweise $\pi = 2{,}30 \,.\, [HA]$, während diejenige des heterogenen Systems $\pi_{HA} = 2{,}30 \,.\, [A']$ ist.

Voraussetzung für die Ableitung der vorstehenden Gleichungen war, daß die Konzentration der nichtdissoziierten Säure konstant bleibt. Dies ist nicht nur durch die Gegenwart eines Bodenkörpers zu verwirklichen, sondern ebenso durch das Gleichgewicht der Lösung mit einer Gasphase von konstantem Partialdruck der betreffenden Säure, z. B. Kohlensäure. Völlig analog sind Systeme mit Basen als Bodenkörper zu behandeln.

Eine weitere Reihe von puffernden heterogenen Systemen sei durch das folgende schematische Beispiel gekennzeichnet: Die Lösung einer schwachen Säure mit einem schwer löslichen Salz dieser Säure als Bodenkörper und einem Überschuß des Kations des Salzes in der Lösung. Es sei näher auf das praktisch wichtige heterogene System: ***Kohlensäure und Calciumsalz in Lösung, Calciumcarbonat als Bodenkörper***, eingegangen. Die Gleichgewichtsbedingungen lauten:

$$[H^{\cdot}] \,.\, [HCO_3'] = K_1 \,.\, [CO_2] \tag{12}$$

$$[H^{\cdot}] \,.\, [CO_3''] = K_2 \,.\, [HCO_3'] \tag{13}$$

$$[Ca^{\cdot\cdot}] \,.\, [CO_3''] = L'p. \tag{14}$$

Aus diesen Gleichungen folgt:

$$[H^{\cdot}] = \sqrt{[CO_2] \,.\, [Ca^{\cdot\cdot}] \cdot \frac{K_1 \,.\, K_2}{L'p}} \tag{15}$$

$$p_H = -\tfrac{1}{2} \log [CO_2] - \tfrac{1}{2} \log [Ca^{\cdot\cdot}] - \tfrac{1}{2} \log \frac{K_1 \,.\, K_2}{L'p}. \tag{16}$$

Für die Veränderung des Wasserstoffexponenten gilt sodann:

$$dp_H = -\frac{0{,}4343}{2} \cdot \frac{d[CO_2]}{[CO_2]} - \frac{0{,}4343}{2} \cdot \frac{d[Ca^{\cdot\cdot}]}{[Ca^{\cdot\cdot}]}. \tag{17}$$

Falls die Konzentration an Hydrocarbonationen (und natürlich erst recht an Carbonationen) im Vergleich zu den Konzentrationen an Kohlensäure und Calciumionen zu vernachlässigen ist, wird der chemische Vorgang bei Zusatz von Lauge im wesentlichen durch die Gleichung:

$$2\,OH' + CO_2 + Ca^{\cdot\cdot} = CaCO_{3\,fest} + H_2O$$

dargestellt, d. h. auf 1 Äquivalent Base verschwinden je ½ g-Molekül Kohlensäure und Calciumionen:

$$dB = -\tfrac{1}{2}\, d[CO_2] \tag{18}$$

$$dB = -\tfrac{1}{2}\, d[Ca^{\cdot\cdot}]. \tag{19}$$

Für die Nachgiebigkeit folgt sodann aus (17), (18) und (19):

$$\left(\frac{dp_H}{dB}\right)_{CaCO_3} = 0{,}4343\left(\frac{1}{[CO_2]} + \frac{1}{[Ca^{\cdot\cdot}]}\right) \tag{20}$$

und ferner für die Pufferungskapazität:

$$\pi_{CaCO_3} = \left(\frac{dB}{dp_H}\right)_{CaCO_3} = 2{,}30\,\frac{[CO_2]\,.\,[Ca^{\cdot\cdot}]}{[CO_2] + [Ca^{\cdot\cdot}]}. \tag{21}$$

Ist ferner auch die Konzentration an Kohlensäure konstant (also $d[CO_2] = 0$), was der Fall ist, wenn der Partialdruck der Kohlensäure in der mit dem System im Gleichgewicht befindlichen Gasphase konstant ist, dann folgt aus (17) und (19) für das dreiphasige System:

$$\left(\frac{dp_H}{dB}\right)_{CaCO_3,\,CO_2} = 0{,}4343 \cdot \frac{1}{[Ca^{\cdot\cdot}]} \tag{22}$$

$$\pi_{CaCO_3,\,CO_2} = 2{,}30\,.\,[Ca^{\cdot\cdot}]. \tag{23}$$

Die beiden letzten Gleichungen dürften für das Verständnis der Verhältnisse bei der Bodenacidität von Bedeutung sein.

Auch in den beiden letzten Fällen ist die Pufferungskapazität des homogenen Systems:

$$\pi = 2{,}30 \cdot \frac{[CO_2]\,.\,[HCO_3']}{[CO_2] + [HCO_3']} \tag{24}$$

wesentlich kleiner als die der heterogenen Systeme, da nach Voraussetzung $[HCO_3'] \ll [Ca^{\cdot\cdot}]$ sein soll.

8. Allgemeiner Fall.

Es sei ein System gegeben, in dem die Wasserstoffionenkonzentration durch folgendes Gleichgewicht bestimmt ist:

$$\nu H^{\cdot} + \alpha_1 A_1 + \alpha_2 A_2 + \cdots \rightleftharpoons \beta_1 B_1 + \beta_2 B_2 + \cdots \tag{25}$$

In dieser Gleichung sind mit A_1, A_2 ..., B_1, B_2, ... die einzelnen an dem Gleichgewicht beteiligten Molekelarten und mit ν sowie α_1, α_2, ..., β_1, β_2, ... die zugehörigen Molekularfaktoren bezeichnet. Nach dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich sodann für die Wasserstoffionenkonzentration der Ausdruck:

$$[H^{\cdot}] = \sqrt[\nu]{K \cdot \frac{[B_1]^{\beta_1}\,.\,[B_2]^{\beta_2} \cdots}{[A_1]^{\alpha_1}\,.\,[A_2]^{\alpha_2} \cdots}}, \tag{26}$$

worin K die Massenwirkungskonstante ist. Für den Wasserstoffexponenten gilt:

$$p_H = \frac{1}{\nu}\Big\{-\log K - \beta_1 \log[B_1] - \beta_2 \log[B_2] - \cdots + \alpha_1 \log[A_1] + \alpha_2 \log[A_2] + \cdots\Big\}. \tag{27}$$

Für die Veränderung des Wasserstoffexponenten folgt:

$$dp_H = \frac{0{,}4343}{\nu}\left\{-\frac{\beta_1 d[B_1]}{[B_1]} - \frac{\beta_2 d[B_2]}{[B_2]} - \cdots + \frac{\alpha_1 d[A_1]}{[A_1]} + \frac{\alpha_2 d[A_2]}{[A_2]} + \cdots\right\} \tag{28}$$

In Gleichung (28) fallen natürlich die Glieder derjenigen Konzentrationen weg, die infolge heterogener Gleichgewichtsbedingungen konstant zu setzen sind. Es sei weiter die vereinfachende Voraussetzung gemacht, daß die Wasserstoffionenkonzentration bzw. Hydroxylionenkonzentration gegenüber den Konzentrationen der übrigen Reaktionsteilnehmer klein ist. Dann erfolgt bei Zugabe von starken Säuren, d. h. Wasserstoffionen, in der Menge dS die Reaktion (25) praktisch quantitativ in dem Umfange $\frac{1}{\nu} dS$. Daraus folgt:

$$dS = -\frac{\alpha_1}{\nu} \cdot d[A_1] = -\frac{\alpha_2}{\nu} \cdot d[A_2] = \cdots$$
$$= \frac{\beta_1}{\nu} \cdot d[B_1] = \frac{\beta_2}{\nu} \cdot d[B_2] = \cdots \qquad (29)$$

Aus den beiden letzten Gleichungen ergibt sich:

$$\frac{dp_H}{aB} = -\frac{dp_H}{dS} = 0{,}4343 \left\{\frac{1}{[A_1]} + \frac{1}{[A_2]} + \cdots + \frac{1}{[B_1]} + \frac{1}{[B_2]} + \cdots\right\}. \qquad (30)$$

Die Nachgiebigkeit eines beliebigen puffernden Gleichgewichts ist somit gleich der mit 0,4343[1]*) multiplizierten Summe der reziproken Werte der Konzentrationen sämtlicher variabler Reaktionsteilnehmer ohne Rücksicht auf die zugehörigen Molekularfaktoren.* Die oben behandelten speziellen Beispiele können sämtlich mit Hilfe dieser allgemeinen Gleichung abgeleitet werden.

Den vorstehenden Betrachtungen liegt die Annahme zugrunde, daß das durch die zugesetzte Base in das System hineingebrachte Hydroxylion in einer einzigen chemischen Reaktion verbraucht wird. Sind mehrere chemische Vorgänge beteiligt, so ist zu unterscheiden zwischen Reaktionen, die lediglich das Wasserstoffion als gemeinsames Glied enthalten, und solchen, die auch durch andere Molekül- bzw. Ionenarten miteinander verknüpft sind. Bei den ersteren ist, wie schon erwähnt, die Pufferungskapazität des Gesamtsystems nach *M. Koppel* und *K. Spiro* sowie *D. D. van Slyke* gleich der Summe der Pufferungskapazitäten der einzelnen Gleichgewichte [vgl. Gleichung (8)]. Im zweiten Falle jedoch, z. B. bei der Dissoziation mehrstufiger Elektrolyte (mehrbasische Säuren, Ampholyte), gilt diese Additivität nicht; es sei auf die von *M. Koppel* und *K. Spiro* abgeleiteten Formeln verwiesen. Diese sind jedoch praktisch nur dann von Bedeutung, wenn die Dissoziationskonstanten der verschiedenen Stufen etwa von der gleichen Größenordnung sind, da im allgemeinen nur diejenigen Reaktionen in Rechnung zu ziehen sind, deren Gleichgewichtskonstante von der Größenordnung der Wasserstoffionenkonzentration des Systems ist [vgl. die Diskussion von Formel (6)].

4. Pufferung gegenüber schwachen Basen oder Säuren.

Die bisherigen Betrachtungen erstreckten sich auf die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration durch Zugabe von starken Basen

[1]) Der Faktor 0,4343 rührt von der Verwendung des dekadischen Logarithmus im Wasserstoffexponenten her.

bzw. starken Säuren. Ist die Pufferungskapazität des Systems gegeben, so folgt für die Veränderung des Wasserstoffexponenten der Ausdruck:

$$dp_H = \frac{1}{\pi} \cdot dB = -\frac{1}{\pi} \cdot dS. \tag{31}$$

In der Praxis jedoch sind auch diejenigen Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration von Interesse, die durch Zugabe von schwachen Basen oder Säuren bedingt sind. Setzt man zu einem System von gegebener Pufferungskapazität π und gegebener Wasserstoffionenkonzentration eine schwache Säure in der Menge ds mit der Dissoziationskonstante K_s, dann ist der Dissoziationsgrad ϑ der zugefügten Säure bestimmt durch folgende Gleichungen:

$$\frac{\vartheta \cdot [H^+]}{1-\vartheta} = K_s, \tag{32}$$

$$\vartheta = \frac{1}{1+\frac{[H^+]}{K_s}}. \tag{33}$$

Die Verschiebung des puffernden Gleichgewichts erfolgt also nicht im Betrage ds, sondern nur nach Maßgabe des dissoziierten Anteils, d. h. von $\vartheta \cdot ds$; für die Veränderung des Wasserstoffexponenten ergibt sich somit:

$$dp_H = -\frac{1}{\pi} \vartheta \cdot ds, \tag{34}$$

$$\frac{dp_H}{ds} = -\frac{1}{\pi} \cdot \frac{1}{1+\frac{[H^+]}{K_s}}. \tag{35}$$

Diese Gleichung gibt nicht nur die durch den Zusatz von Säuren bedingte Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration wieder, sondern ganz allgemein von Stoffen, die Wasserstoffionen abspalten können. Dazu gehören insbesondere auch die Kationen schwacher Basen, da diese in Wasserstoffionen und freie Base zerfallen können[1]). Wird mit K_b die Basendissoziationskonstante der zugrunde liegenden Base und mit K_w das Ionenprodukt des Wassers bezeichnet, so ergibt sich als scheinbare Säuredissoziationskonstante (Hydrolysekonstante des Basenkations):

$$K_s = \frac{K_w}{K_b}. \tag{36}$$

Für die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration gilt infolgedessen die Gleichung:

$$\frac{dp_H}{ds} = -\frac{1}{\pi} \cdot \frac{1}{1+\frac{[H^+] \cdot K_b}{K_w}}. \tag{37}$$

Die Beeinflussung der Wasserstoffionenkonzentration eines Systems mit der Pufferungskapazität π durch Zusatz einer Base mit der Dissoziationskonstante K_b ist durch Gleichung (38) bestimmt:

$$\frac{dp_H}{db} = \frac{1}{\pi} \cdot \frac{1}{1+\frac{K_w}{[H^+] \cdot K_b}}. \tag{38}$$

---

[1]) Vgl. *J. N. Brönsted.* Einige Bemerkungen über den Begriff der Säuren und Basen. Rec. trav. chim. Pays-Bas 42, 718, 1923.

Als Basen sind alle Stoffe zu betrachten, die Wasserstoffionen aufnehmen können, also insbesondere auch die Anionen schwacher Säuren. Wird deren Dissoziationskonstante mit K_s bezeichnet, so gilt:

$$\frac{dp_H}{db} = \frac{1}{\pi} \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_s}{[H^+]}} \cdot \tag{39}$$

Die Gleichungen (37) und (39) können auch mit Hilfe der nachstehend entwickelten Summenformel (40) abgeleitet werden, indem man sich den Zusatz der Bestandteile des reaktionsändernden Salzes (Base + Säure) nicht gleichzeitig, sondern nacheinander vollzogen denkt.

Die Gleichungen (35) bis (39) stellen die allgemeine Form für die Beeinflussung der Wasserstoffionenkonzentration eines Systems dar. Für die Praxis als besonders wichtig seien folgende Spezialfälle hervorgehoben:

1. Zusatz von sauren Stoffen, $[H^+] \ll K_s$ bzw. $[H^+] \ll \frac{K_w}{K_b}$.

In diesem Falle verschwindet das zweite Glied des Nenners von Gleichung (35) bzw. (37), und man erhält die einfache Form:

$$\frac{dp_H}{ds} = -\frac{1}{\pi}$$

Ist umgekehrt $[H^+] \gg K_s$ bzw. $[H^+] \gg \frac{K_w}{K_b}$, so ist einfach $\frac{dp_H}{ds} = 0$.

2. Zusatz von basischen Stoffen, $[H^+] \gg \frac{K_w}{K_b}$ bzw. $[H^+] \gg K_s$.

In diesem Falle verschwindet das zweite Glied des Nenners von Gleichung (38) bzw. (39) und man erhält:

$$\frac{dp_H}{db} = \frac{1}{\pi}.$$

Ist umgekehrt $[H^+] \ll \frac{K_w}{K_b}$ bzw. $[H^+] \ll K_s$, so ist einfach $\frac{dp_H}{db} = 0$.

5. Die Wasserstoffionenkonzentration von Gemischen pufferndor Systeme.

Es erhebt sich weiterhin die Frage, wie die Wasserstoffionenkonzentration eines gegebenen Systems mit bekannter Pufferungskapazität durch Zugabe einer beliebig zusammengesetzten Lösung verändert wird. Diesen Fall kann man in der Weise behandeln, daß man so rechnet, als ob die einzelnen Bestandteile der zuzugebenden Lösung nicht gleichzeitig, sondern nacheinander zugesetzt werden. Die durch die Komponenten hervorgerufenen Änderungen des Wasserstoffexponenten superponieren sich und man erhält infolgedessen die Summenformel:

$$dp_H = \frac{1}{\pi}\left\{-\sum_i \frac{ds_i}{1 + \frac{[H^+]}{K_{s_i}}} + \sum_j \frac{db_j}{1 + \frac{K_w}{[H^+] \cdot K_{b_j}}}\right\}. \tag{40}$$

Es sei nunmehr zu folgendem allgemeineren Fall übergegangen: Gegeben sind zwei Systeme, von denen nicht nur die Wasserstoffexponenten

p_{H1} und p_{H2} und die Pufferungskapazitäten π_1 und π_2 bekannt sind, sondern auch der Verlauf der beiden Titrationskurven: $B = \varphi_1(p_H)$ und $B = \varphi_2(p_H)$. Es soll der Wasserstoffexponent p_{Hm} gefunden werden, der sich beim Vermischen des Volumens v_1 des ersten Systems mit dem Volumen v_2 des zweiten Systems ergibt. Dabei soll vorausgesetzt werden, daß beim Mischen der beiden Systeme keine neuen Gleichgewichte auftreten, wie z. B. die Ausfällung eines Niederschlags, Komplexbildung. Die Titrationskurve des Gemisches setzt sich additiv aus denen der einzelnen Systeme zusammen[1]):

$$B = \varphi_m(p_H) = \frac{v_1}{v_1 + v_2} \cdot \varphi_1(p_H) + \frac{v_2}{v_1 + v_2} \cdot \varphi_2(p_H). \tag{41}$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich als Wasserstoffexponent der Mischung der Wasserstoffexponent für $B = 0$ oder die Bedingungsgleichung:

$$\frac{v_1}{v_1 + v_2} \varphi_1(p_{Hm}) + \frac{v_2}{v_1 + v_2} \varphi_2(p_{Hm}) = 0. \tag{42}$$

Werden mehr als zwei Systeme gemischt, so ergibt sich sinngemäß unter Weglassung des gemeinsamen Nenners $\left(\sum v_i\right)$ die Gleichung:

$$\sum_i v_i \cdot \varphi_i(p_{Hm}) = 0. \tag{43}$$

Sind die Titrationskurven nicht als analytische Funktionen, sondern lediglich in graphischer Darstellung gegeben, so konstruiert man nach Gleichung (42) die Summenkurve. Der Schnittpunkt dieser Summenkurve mit der Ordinatenachse (d. h. $B = 0$) ergibt den Wasserstoffexponenten p_{Hm} der Mischung.

Ein besonders einfacher Fall liegt vor, wenn die Titrationskurve der zu mischenden Systeme in dem in Frage kommenden Gebiet annähernd geradlinig verlaufen, was für praktisch wichtige Systeme vielfach zutrifft. Dann kann man setzen:

$$B = \varphi_1(p_H) = \pi_1 \cdot (p_H - p_{H1}) \tag{44a}$$

$$B = \varphi_2(p_H) = \pi_2 \cdot (p_H - p_{H2}). \tag{44b}$$

In Verbindung mit Gleichung (43) folgt:

$$v_1 \cdot \pi_1 \cdot (p_H - p_{H1}) + v_2 \cdot \pi_2 \cdot (p_H - p_{H2}) = 0. \tag{45}$$

Für den Wasserstoffexponenten p_{Hm} ergibt sich also:

$$p_{Hm} = \frac{v_1 \cdot \pi_1 \cdot p_{H1} + v_2 \cdot \pi_2 \cdot p_{H2}}{v_1 \cdot \pi_1 + v_2 \cdot \pi_2} \tag{46}$$

bzw. für die Mischung von mehr als zwei Systemen:

$$p_{Hm} = \frac{\sum_i (v_i \cdot \pi_i \cdot p_{Hi})}{\sum_i (v_i \cdot \pi_i)}. \tag{47}$$

Letztere Gleichungen dürften z. B. für die Berechnung der Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration beim Verschneiden von Weinen von praktischer Bedeutung sein.

---

[1]) Streng genommen müßten die Titrationskurven der Einzelsysteme nach der Verdünnung auf das Volumen $v_1 + v_2$ bekannt sein. Im allgemeinen ändert sich jedoch die Form der Titrationskurven bei Verdünnung nur sehr wenig, sofern die Wasserstoffionen- und Hydroxylionenkonzentration klein sind, was bei den meisten praktisch wichtigen Fällen zutrifft.

Zusammenfassung.

1. Für die Pufferung heterogener Gleichgewichte sowie beliebig komplizierter Gleichgewichte überhaupt wurde abgeleitet, daß die Nachgiebigkeit (reziproker Wert der Pufferungskapazität) gleich der mit 0,4343 multiplizierten Summe sämtlicher variabler Reaktionsteilnehmer ohne Rücksicht auf die zugehörigen Molekularfaktoren ist.

2. Es werden Formeln für die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration von Systemen mit bekannter Pufferungskapazität bei Zusatz von schwachen Basen und Säuren abgeleitet.

3. Es werden Methoden zur Berechnung der Wasserstoffionenkonzentration von Gemischen pufferner Systeme abgeleitet.

Blutdruck, Blutcholesterin und Diurese nach Zufuhr von Gallensäuren.

Vorläufige Mitteilung.

Von

D. Adlersberg und **M. Taubenhaus.**

(Aus der I. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 16. August 1926.)

Die Feststellung von *Neubauer* (1) und später unabhängig davon von *Pohl* (8), daß ein Glied der Gallensäuregruppe, die dehydrierte Cholsäure (Dehydrocholsäure = Decholin) praktisch ungiftig ist, war für die therapeutische Anwendung der Gallensäuren, aber auch für das Studium der Rolle derselben für Physiologie und Pathologie von großer Bedeutung. Seit der Einführung dieser Substanz in die Therapie durch *Adlersberg* und *Neubauer* (2) wurden die günstigen Erfahrungen bereits von *Hoesch* (9), *Adler* (4) u. a. bestätigt. Die geringen Nebenwirkungen der Dehydrocholsäure, der Mangel einer stärkeren hämolytischen bzw. Herzwirkung ermöglichte es aber auch, die Wirkung der Gallensäure als solcher bzw. der durch sie verursachten Cholerese auf den Organismus zu studieren [vgl. *Adlersberg* und *Neubauer* (3), *Adler* (4)].

Den Ausgangspunkt dieser Untersuchungen bildeten folgende Überlegungen. Wie *Neubauer* (1), ferner *Adlersberg* und *Neubauer* (2) (3) feststellen konnten, beeinflußt die Zufuhr von Gallensäuren (Dehydrocholsäure) in einzelnen Fällen die Diurese in eindeutiger Weise, andererseits kommt es zu einem Abfall des Blutcholesterins [*Adlersberg* und *Neubauer* (3) unabhängig davon *Adler* (4)]. Mit Rücksicht darauf, daß zwischen diesen zwei Erscheinungen gegenseitige Beziehungen bestehen könnten [*Heilig* und *Lederer* (5)] wurde zunächst bei einer Anzahl von normalen und pathologischen Fällen im akuten Versuch die Beeinflussung des Blutcholesterins und der Diurese geprüft. In diesem Zusammenhang mußte auch die Blutdruckkurve sorgfältig registriert werden, und zwar nicht nur wegen der *direkten* Bedeutung derselben für die Diurese. Ist doch in neuerer Zeit auch in Deutschland dem Cholesterin eine besondere Rolle bei der Regulierung des Blutdrucks

zugeschrieben worden [*Kauffmann* (6), *Westphal* (7)], und so lag immerhin die Möglichkeit vor, daß die nach Zufuhr der Gallensäure entstehende Abnahme des Blutcholesterins auch vielleicht auf dem Wege über die Beeinflussung des Blutdrucks eine Veränderung der Diurese bedingen könnte.

Die Versuche wurden 3 bis 4 Stunden nach einer Mahlzeit (Frühstück bzw. Mittagessen) begonnen. Während der Versuchsdauer blieben die Patienten im Bett und enthielten sich jeder Nahrungsaufnahme. In einer etwa eine halbe Stunde dauernden Vorperiode wurde der systolische Blutdruck (Apparat von *Riva-Rocci*, breite Oberarmmanschette nach *Recklinghausen*) am gleichen Arm mehrmals bestimmt und nur bei konstanten Werten der darauf folgende Versuch ausgeführt. Knapp vor der Injektion der Gallensäure wurde Blut zur Cholesterinbestimmung (Methode nach *Authenrieth-Funck*) aus der Kubitalvene entnommen. Nach intravenöser Zufuhr von 10 ccm einer 20proz. Lösung von dehydrocholsaurem Natrium (Decholin) wurde wieder durch 2 bis 3 Stunden in 5 bis 30 Minuten dauernden Intervallen der Blutdruck, in 60 bis 90 Minuten dauernden Zeitabständen das Cholesterin bestimmt. In den meisten Versuchen wurde aber neben dem Ausgangswert nur noch im Zeitpunkt des tiefsten Blutdrucks die Cholesterinbestimmung ausgeführt. In Versuchen, in denen auch der Einfluß auf die Diurese geprüft wurde, wurde der Harn 1- oder 2stündlich abgegrenzt, wobei sich die Vorperiode auf mehrere Stunden erstreckte.

Im ganzen konnten bisher an insgesamt 14 Personen: in 18 Versuchen das Verhalten des Blutdrucks, in 14 Versuchen die Veränderungen des Blutcholesterins und in 13 Versuchen die Beeinflussung der Diurese geprüft werden.

Bei der Beurteilung der Veränderungen des *Blutdrucks* kann nur auf Ausschläge über 10 mm Hg Gewicht gelegt werden, da wir wenigstens diesen Bereich als die physiologische Schwankungsbreite der Methodik ansehen müssen. Um auch die psychische Beeinflussung des Blutdrucks durch die Injektion auszuschalten, wurden für diese Versuche nur Personen herangezogen, die an Blutentnahmen und Injektionen gewöhnt waren. Von den uns vorliegenden 18 Blutdruckkurven zeigt sich bei sechs Fällen in sechs Versuchen der Blutdruck unverändert, indem sich die Schwankungen innerhalb 10 mm Hg bewegen. Von diesen Fällen zeigen fünf einen normalen, einer einen erhöhten Blutdruck (212 mm Hg). In sechs Fällen zeigt sich an zwölf Kurven eine Abnahme des Blutdrucks nach der Injektion um 12 bis 30 mm Hg. Diese Fälle zeigen mit einer Ausnahme erhöhte Ausgangswerte (nephrogener bzw. essentieller Hochdruck). Bei drei von diesen mit Abfall des Blutdrucks reagierenden Fällen wurden zwecks Kontrolle in mehrtägigen Intervallen zwei Versuche, in einem Falle vier Versuche ausgeführt. Als Beispiel für das Verhalten der positiv reagierenden Fälle möge Fall 2 dienen (siehe Tabelle I), bei dem jedesmal nach der Injektion der Blutdruck abfällt, um sich dann wieder dem Ausgangswert zu nähern.

Auch bei der Verwertung der *Blutcholesterin*zahlen kann nur auf größere Schwankungen Gewicht gelegt werden. Von den diesbezüglich untersuchten zwölf Fällen (vgl. Tabelle II) zeigen sieben einen normalen Ausgangswert, ein Fall zeigt eine beträchtliche Hypocholesterinämie, vier Fälle eine Erhöhung des Blutcholesterins. Bei den ersteren sehen wir auf Zufuhr von Dehydrocholsäure in drei Fällen einen deutlichen Abfall von 25 bis 30 Proz., bei den vier anderen einen Anstieg, der 7 bis 12 Proz. beträgt, somit eigent

Tabelle I.

Drei Blutdruckversuche bei Fall 2. *Pauline R.* Chronische Nephritis. Herzinsuffizienz, Stauungsorgane.

I. Versuch		II. Versuch		III. Versuch	
Zeit 25. X. 1925	Blutdruck mg Hg	Zeit 30 X. 1925	Blutdruck mg Hg	Zeit 2. XI. 1925	Blutdruck mg Hg
9h20′	185	4h20′	180	4h09′	183
9 35	187	4 25	182	4 15	180
9 45	192	4 30	185	4 35	185
9 48	197	4 45	180	4h35′ 10 ccm 20 proz.	
9 50	195	4h45′ 10 ccm 20 proz.		Decholin intravenös	
10h00′ 10 ccm 20 proz.		Decholin intravenös		4h45′	180
Decholin intravenös		4h53′	160	5 15	162
10h15′	170	4 55	160	5 35	166
10 20	157	5 02	162	5 57	163
10 40	163	5 17	165	6 10	166
11 00	164	5 35	165	6 22	162
11 05	163	5 58	168	6 43	170
11 25	166	6 15	163	7 45	178
11 30	163	6 35	167		
11 45	187	6 55	160		
11 55	192	7 15	158		
12 15	190	7 25	162		
		7 35	162		

Tabelle II.

Cholesteringehalt des Serums.

Fall	Versuch	Vor der Injektion Cholesterin mg-Proz.	Nach der Injektion		Diagnose
			Minuten	Cholesterin mg-Proz.	
1	I	514	55	472	Nephritis, nephrotischer Einschlag, Herzinsuffizienz
			100	456	
	II	515	85	502	
			120	468	
2	I	270	100	188	Nephritis chron., Herzinsuffiz.
	II	254	105	220	
3	I	90	85	97	Normalfall
			150	97	
4	I	147	90	109	Myodegeneratio cardis, Stauungsorgane
5	I	192	105	160	Icterus catarrhalis, Gravidität
6	I	128	105	144	Hochdruckstauung
7	I	141	70	109	Chron. Nephritis, Darmkatarrh
8	I	116	90	126	Normalfall
9	I	48	90	50	Septische Endocarditis, Herzinsuffizienz
10	I	388	100	318	Icterus catarrhalis
11	I	130	115	91	" "
12	I	152	50	165	Arteriosclerose, Herzinsuffizienz

lich innerhalb der Schwankungsbreite liegt. Von den vier Fällen mit Hypercholesterinämie zeigen sämtliche, und zwar in sechs Versuchen einen deutlichen Abfall des Blutcholesterins, was mit den Befunden von *Adlersberg* und *Neubauer* (3) im Wesen übereinstimmt. Der höchste Abfall beträgt hier 30, der tiefste 11 Proz. Ein Fall von Hypocholesterinämie bleibt unverändert.

Tabelle III.

Diureseversuch.

Fall	Versuch	Zeit	Harn		Eiweißgehalt im Harn Prom.	
			Menge ccm	Spez. Gew.		
2 Nephritis chronica. Insuffic. cordis	II	11h30'-1h30'	23	—	—	
		1 30-3 30	75	1023	—	
		3 30-5 30	170	1014	—	4h45' 10 ccm
		5 30-7 30	200	1013	—	20proz. Decholin
		7 30-9 30	130	1011	—	intravenös
	III	12h- 2h	80	1021	5	
		2 - 4	60	1023	5	
		4 - 6	215	1011	$2^3/_4$	4h35' 10 ccm
		6 - 8	175	1008	2	20proz. Decholin
		8 -10	110	1010	$2^3/_4$	intravenös
	IV	12 - 2	75	1018	4	
		2 - 4	75	1020	5	
		4 - 6	180	1012	$2^3/_4$	4h45' 10 ccm
		6 - 8	110	1009	$2^1/_3$	20proz. Decholin
		8 -10	154	1008	2	intravenös
13 Cholelithiasis	I	6 - 7	29	1023	—	
		7 - 8	29	1024	—	
		8 - 9	47	1017	—	
		9 -10	180	1005	—	9h05' 10 ccm
		10 -11	120	1009	—	20proz. Decholin
		11 -12	170	1011	—	intravenös
		12 - 1	51	1013	—	

Bezüglich der *Diurese* zeigen von den 13 Kurven fünf keinen wahrnehmbaren Einfluß der Dehydrocholsäureinjektion auf dieselbe, in den übrigen Fällen ist ein sicherer Einfluß vorhanden: die Harnmenge steigt nach Decholinzufuhr an, das spezifische Gewicht nimmt ab. Als Beispiele für mehrere gleicher Art seien drei bei Fall 2 und eine bei Fall 13 gewonnene Kurven angeführt (vgl. Tabelle III). Es handelt sich im Falle 2 um eine chronische Nephritis mit kardialer Insuffizienz und schlechter Diurese. Die gleichzeitig gewonnenen Blutdruckkurven sind in Tabelle I mitgeteilt. Sowohl unter den positiv, also mit Vermehrung der Diurese, als auch unter den negativ reagierenden Fällen sind Versuchspersonen mit normalem Herzgefäßapparat, aber auch solche mit Störung der Diurese infolge Nieren- oder Herzerkrankungen vorhanden. Es läßt sich von vornherein weder beim normalen, noch beim kranken Menschen voraussagen, ob nach Zufuhr von Dehydrocholsäure eine vermehrte Diurese eintreten wird. Im selben Sinne sprechen auch seit drei Jahren fortgesetzte Beobachtungen über die Beeinflussung der Gesamttagesmenge des Harns bei den mit Decholin behandelten Fällen (vor allem Erkrankungen der Gallenwege und der Leber).

Den zahlreichen mit Vermehrung der Diurese reagierenden Fällen stehen ebensoviele negative Resultate gegenüber. Zur vorläufigen Erklärung für dieses verschiedene Verhalten normaler und kranker Menschen ließe sich vielleicht ein im Laufe der Zeit gewonnener Eindruck heranziehen: man sieht mitunter, daß Fälle, bei denen nach Injektion der Gallensäure, nach verschiedenen Symptomen beurteilt, keine beträchtliche Cholerese anzunehmen wäre, einen Anstieg der Diurese aufweisen und umgekehrt. Auch konnten *Adlersberg* und *Neubauer* (3) eine solche Beobachtung an dem von ihnen publizierten Falle von Choledochusfistel machen. Es bestanden in diesem Falle, wie die histologische Untersuchung ergab, schwere Leberveränderungen; nach Injektion von Decholin zeigte die Temperatur einen Anstieg bis über 39°, die Gallenmenge blieb auffallenderweise *unbeeinflußt*, ihr Bilirubingehalt nahm aber beträchtlich ab. In diesem Falle stieg nun die Tagesharnmenge um rund 50 bis 70 Proz. an. Wenn auch dieses Verhalten keineswegs regelmäßig zu beobachten ist, so glauben wir doch eine Beziehung zwischen dem diuretischen und choleretischen Effekt des Decholins annehmen zu dürfen. Ob nun die Vermehrung der Diurese als direkte Folge einer nicht suffizienten Ausscheidung der Gallensäure durch die Leber aufzufassen ist oder vielleicht die Gallensäure in dem einen Falle die gallensekretorische Tätigkeit, in einem anderen die den Wasserhaushalt beherrschende Funktion der Leber beeinflußt, läßt sich derzeit nicht entscheiden. Während Fälle mit Stauungsleber vielfach sehr günstig zu reagieren scheinen, läßt sich dies mitunter beim ganz normalen Menschen ebenfalls feststellen. Die Frage muß weiteren Untersuchungen überlassen werden.

Für das Bestehen *gegenseitiger Beziehungen* zwischen Blutdruck, Blutcholesterin und Diurese läßt sich in unseren Versuchen kein sicherer Anhaltspunkt finden. In einzelnen Fällen zeigt sich bei unveränderter Diurese eine Abnahme des Blutcholesterins und deutlicher Abfall des Blutdrucks. Bei anderen ist bei den gleichen Veränderungen von Blutdruck und Blutcholesterin ein starker Anstieg der Diurese zu beobachten. Auch konnte mitunter Diuresevermehrung bei unverändertem Blutdruck und Blutcholesterin festgestellt werden, ebenso wie die Abnahme des Blutcholesterins durchaus nicht immer zu einer Beeinflussung des Blutdrucks führt. Allerdings geht relativ häufig dem Diureseanstieg eine Abnahme des Blutcholesterins parallel, während der Blutdruck, namentlich bei normaler Höhe desselben, keine Veränderung aufzuweisen braucht. Auf eine ausführlichere Darstellung dieser Beziehungen kann hier nicht mehr eingegangen werden [1]).

Zusammenfassung.

Der *Blutdruck* bleibt nach Zufuhr von Gallensäure (Decholin) in einem Drittel der Fälle unverändert, in zwei Dritteln zeigt sich eine Abnahme von 12 bis 30 mm Hg und Wiederanstieg auf die Norm nach einigen

[1]) Im Rahmen noch nicht publizierter Untersuchungen von *Adlersberg* und *Róth*, die sich mit den Beziehungen zwischen der „äußeren" und „inneren" Sekretion der Leber und mit der experimentellen Glykocholie beschäftigen, konnte nach Anregung der Gallensekretion durch Decholin beim Kaninchen eine mitunter beträchtliche Abnahme des Nüchternblutzuckers und verlangsamter Ablauf der experimentellen Hyperglykämie beobachtet werden.

Stunden. Das *Blutcholesterin* zeigt bei Fällen mit normalem Ausgangswert in drei von sieben Versuchen einen Abfall von 25 bis 30 Proz., in vier Versuchen einen innerhalb der Fehlergrenzen liegenden Anstieg von 7 bis 12 Proz. Vier Fälle von Hypercholesterinämie zeigen eine Abnahme desselben um 11 bis 30 Proz., ein Fall von Hypocholesterinämie bleibt unverändert. Die *Diurese* bleibt in 13 Versuchen fünfmal unverändert, in acht Fällen ist eine deutliche Vermehrung der Harnmenge und Abfall des spezifischen Gewichts zu beobachten. In analoger Weise läßt sich auch bei Beobachtung der Gesamtharnmenge ein Anstieg derselben, aber keineswegs regelmäßig, feststellen. Gegenseitige Beziehungen zwischen Veränderungen des Blutdrucks, des Blutcholesterins und der Diurese konnten nicht mit Sicherheit festgestellt werden, wenn auch häufig Abnahme des Blutcholesterins mit Anstieg der Diurese einhergeht.

Nach Abschluß dieser Arbeit erschien eine Mitteilung von *Semler* (Med. Klin. 1926, Nr. 23), die sich mit dem Einfluß des Decholins auf die Diurese beschäftigt.

Literatur.

1) *Neubauer*, Klin. Wochenschr. 1923, Nr. 23; 1924, Nr. 20. — 2) *Adlersberg* und *Neubauer*, ebendaselbst 1925, Nr. 7; Wien. Arch. f. inn. Med. **10**, 59, 1925. — 3) *Dieselben*, Zeitschr. f. exper. Med. **48**, 291, 1926; Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 1926 (erscheint demnächst). — 4) *Adler*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **46**, 371, 1925. — 5) *Heilig* und *Lederer*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 39. — 6) *Kauffmann*, Zeitschr. f. exper. Med. **42**, 473, 1924; **43**, 141, 1924; Zeitschr. f. klin. Med. **100**, 677 und 702. 1924. — 7) *Westphal*, Zeitschr. f. klin. Med. **101**, 545. 558 u. 566, 1925. — 8) *Pohl*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **30**, 423. 1922. — 9) *Hoesch*. Münch. med. Wochenschr. 1926. Nr. 9.

Über das Komplement der Amylasen [V][1] und die Zucker-Eiweißkondensation.

Von

Hans Pringsheim und **Margot Winter.**

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 17. August 1926.)

I.

Vor kurzem[1]) teilten wir mit, daß das Hefekomplement durch pepsinverdautes Hühnereiweiß vertreten werden kann. Unverdautes Hühnereiweiß wirkt nach unserer nunmehrigen Feststellung nicht als Aktivator der Stärkeverzuckerung.

Die Ausdehnung der Versuche auf andere Eiweißarten im pepsinverdauten Zustande zeitigte teils positive, teils negative Ergebnisse, deren Übersichtlichkeit durch Tabelle I, S. 408 erleichtert wird. Verdaute Albumine und Muskeleiweißarten beschleunigten die Amylolyse, während Casein, Gelatine, Elastin und auch Fibrinalbumose selbst im pepsinverdauten Zustande ohne Wirkung blieben. So verhielt sich auch das von *Merck* bezogene Pepton ex albumine. Die Erweiterung der Versuche auf Malzamylase gab in den geprüften Fällen bei pepsinverdautem Eier- und Serumalbumin den entsprechenden positiven, bei Pepton ex albumine den negativen Ausschlag.

Bei unserer Versuchsanstellung blieb das im Pankreatin vorhandene Trypsin infolge der Acidität von $p_H = 5{,}3$ ohne Wirkung auf die verwendeten Eiweißstoffe. Besonders bemerkenswert ist nun das folgende Ergebnis: Stellten wir die Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 2$ nach der Pepsinverdauung zuerst auf 8,4 um und verdauten so mit Trypsin, so blieb die Beschleunigung der Stärkeverzuckerung bei der nachher wieder bei $p_H = 5{,}3$ vorgenommenen Amylolyse aus. Der Aktivator wird also durch saure Fermentation aus Hühnereiweiß gebildet und dann durch alkalische wieder zerstört. Daß dementsprechend die Trypsinverdauung das Pepton ex albumine nicht zum

---

[1]) IV. Mitteilung: *H. Pringsheim* und *G. Otto*, diese Zeitschr. **178**, 399, 1926.

Aktivator machte und auch Tyrosin unwirksam war, entsprach der Erwartung.

Wir nehmen an, daß das Hefekomplement aus dem Eiweiß der Hefe bei der Autolyse gebildet wird. Es wirkt, wie des öfteren in den ersten Mitteilungen hervorgehoben, erst jenseits des Grenzabbaues. Sehr wichtig ist nun, daß die Pepsinverdauung dieses Bild grundlegend ändert. Nicht nur die durch Pepsin enzymatisch gespaltenen Eiweißarten, nein, auch das so vorbereitete Hefekomplement beschleunigen die Verzuckerung der Stärke sowohl durch Pankreas- wie durch Malzamylase ausgesprochen unterhalb der 70proz. Maltosebildung. Der Gegensatz zwischen dem gewöhnlichen Hefekomplement und dem pepsinverdauten Hühnereiweiß, Eieralbumin und Myosin geht besonders aus der fünften Versuchsreihe hervor. Die Umstände der Aktivierung der Stärkeverzuckerung werden also immer komplizierter; das gleiche läßt sich von der Wirkung anderer Cofermente erwarten.

Die Resultate sind in Tabelle I zusammengestellt.

II.

Im Verlauf unserer Komplementversuche beobachteten wir nach Erreichung einer der 100proz. Maltosebildung nahe kommenden Reduktionskraft bei Anwendung der pepsinverdauten Eiweißstoffe einen starken Rückgang der Kupferwerte bis unterhalb der komplementfreien Werte nach der fünften oder siebenten Stunde, und zwar merkwürdigerweise in den meisten Fällen parallel zur Komplementwirkung. Gegensätzlich hierzu war das Ausbleiben des Reduktionsrückganges in den zwei in Verbindung mit Malzamylase untersuchten Beispielen bei pepsinverdautem Eier- und Serumalbumin sowie das ausgesprochene Absinken des Kupferwertes beim Pepton ex albumine, das keinerlei Beschleunigung der Amylolyse hervorzurufen imstande war. Wir haben auch diese Werte in der nachstehenden Tabelle I wiedergegeben.

Als Erklärung für unsere Beobachtungen, die wir noch in keiner Weise quantitativ auswerten wollen, greifen wir auf die Ergebnisse zurück, welche verschiedene Forscher in den beiden letzten Jahren über die Reaktion zwischen Zuckerarten und stickstoffhaltigen Körpern, besonders Aminosäuren, gesammelt haben. So beobachtete *Neuberg*[1]) beim Mischen von Fructoselösung mit d,l-Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Harnstoff und Thioharnstoff eine augenblickliche Erhöhung der Linksdrehung, die mit Glucose nicht eintrat. *Euler*[2])

[1]) *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **162**, 496, 1925; **174** 464, 1926.

[2]) *H. von Euler* und *K. Josephson*, H. **153**, 1, 1926; *H. von Euler, E. Brunius* und *K. Josephson*, H. **155**, 259, 1926; B. **59**, 1581, 1926.

Tabelle I.

Eiweißabbauprodukte	Versuchsreihe	Pankreasamylase: Komplementwirkung	Pankreasamylase: Rückgang der Reduktionskraft	Malzamylase: Komplementwirkung	Malzamylase: Rückgang der Reduktionskraft
Unverdautes Hühnereiweiß	1	—	—		
Pepsinverdautes: Hühnereiweiß	2, 5	+	+		
Pepsinverdautes: Eieralbumin	3, 5	+	+	+ (7)*)	— (7)
Pepsinverdautes: Blutalbumin	3	+	+		
Pepsinverdautes: Serumalbumin	3	+	+	+ (7)	— (7)
Pepsinverdautes: Myosin	4	+	+		
Pepsinverdautes: Myogen	4, 5	+	+		
Pepsinverdautes: Hefekomplem.	6	+			
Pepsinverdautes: Gelatine	8	—	—		
Pepsinverdautes: Casein	9	—	?		
Pepsinverdautes: Elastin	10	—	—		
Pepsinverdautes: Fibrinalbumose	11	—	—		
Pepsin-trypsinverdautes Hühnereiweiß	13	—	—		
Pepton ex albumine	12	—	+	— (7)	— (7)
Trypsinverdautes Pepton ex albumine	13	—	—		
Tyrosin	12	—	— (13)		

*) Die eingeklammerten Zahlen bedeuten Versuchsreihen.

sah die Reaktion zwischen Glucose und Glykokoll wie Alanin bei alkalischer Reaktion mit meßbarer Geschwindigkeit bis zu einem Gleichgewicht verlaufen, während nach *Hynd*[1]) Glucose, Fructose und in schwächerem Maße auch Mannose in alkoholischer wie in wässeriger Lösung mit Harnstoff erst nach mehrmonatigem Stehen Drehwertsabnahme zeigten, die jedoch nicht in veränderter Reduktionskraft zum Ausdruck kam, offenbar weil starkes Alkali sofort wieder spaltend wirkt. So wird auch eine Verbindung von Sarkosin und Glucose, das Sarkosinamidglucosid, durch n/10 Natronlauge sofort gespalten[2]).

Die im Verlauf der Stärkefermentation zwischen Zucker und Eiweißabbauprodukten gebildeten Kondensate sind viel beständiger; nicht allein, daß sich ihre Bildung durch die Titration mit *Fehling*scher Lösung, also bei stark alkalischer Reaktion, erweisen läßt, die Kondensation geht auch im schwach sauren Gebiet, bei der von uns eingehaltenen p_H von 5,3 vor sich. Auch hier scheint die Erreichung einer gewissen, durch Pepsin veranlaßten Eiweißabbaustufe von entscheidendem Einfluß zu sein, da die Trypsinverdauung, z. B. bei Hühnereiweiß, aber auch beim Pepton ex albumine, die Fähigkeit zur Reaktion mit Zucker aufhebt. Erst eingehende Versuche können das verwickelte

[1]) *A. Hynd*, Biochem. Journ. **20**, 195, 1926.
[2]) *K. Maurer*, B. **59**. 827, 1926.

Gebiet klären, so daß wir vorerst auf die Diskussion von Einzelheiten verzichten.

Eine Frage haben wir jedoch experimentell zu entscheiden versucht, ob nämlich Maltose, die ja das Endprodukt der Amylolyse darstellt, direkt kondensierbar ist. Die Tabelle II zeigt, daß das in der Tat und unter denselben Bedingungen bei $p_H = 5{,}3$ und 37° der Fall ist. Auch hier gibt Pepton ex albumine einen sehr starken Ausschlag, der durch Trypsinverdauung sehr abgeschwächt wird, auch hier nimmt die Trypsinwirkung dem pepsinverdauten Hühnereiweiß seine Befähigung, mit Maltose zu reagieren, auch hier hat die freie Aminosäure, das Tyrosin, keine Neigung zur Verbindung mit dem Disaccharid. Wir nehmen also an, daß die Maltose auch in den Stärkeversuchen der reagierende Zucker gewesen ist. Zur Klärung der einschlägigen Fragen stellen wir weitere Untersuchungen, z. B. auch mit anderen Kohlehydraten, in Aussicht.

Tabelle II.

Kondensationsversuche mit Maltose.

Versuchsreihe	Eiweißabbauprodukte	Rückgang der Reduktionskraft
14	Pepsinverdautes Casein	+
14	„ „ Myosin	+
16	Pepsin-trypsinverdautes Hühnereiweiß .	—
15	Pepton ex albumine	++
16	Trypsinverdautes Pepton ex albumine .	+ (schwach)
15	Tyrosin	—

Experimenteller Teil.

Als Substrat wurde eine 1proz. Stärkelösung (lösliche Stärke von *Koehlmann*) verwendet. Der Pankreatinextrakt wurde aus dem Präparat von *Schering* durch 15stündiges Auslaugen mit Wasser hergestellt. Das Hefekomplement gewannen wir durch Verreiben von Bäckereihefe mit wässerigem Toluol. Das Pepsin stammt von *Kahlbaum*, das Pepton ex albumine von *Merck*.

Die Eiweißstoffe wurden stets 20 Stunden bei 37° mit Pepsin verdaut, dann durch Filtration oder Zentrifugieren geklärt und die Pufferung auf $p_H = 5{,}3$ umgestellt. Die Eigenreduktion des Pankreatinextrakts, des Malzauszugs und mancher Eiweißlösungen ist bei den Ergebnissen abgezogen. Die Pufferung erfolgte mit Pufferlösungen nach *Sörensen*; für $p_H = 5$ dienten Citrat + H Cl, für $p_H = 5$ Phosphatgemische, in einigen Fällen auch Borat + H Cl. Die Umstellung der Lösungen von einer Wasserstoffionenkonzentration auf eine andere wurde nach den Tabellen von *H. Pringsheim, A. Genin* nnd *R. Perewosky*[1]) sowie *H. Pringsheim* und *A. Beiser*[2]) vorgenommen. Die Titration geschah stets mit 5 ccm Lösung.

[1]) Diese Zeitschr. **164**, 117, und zwar 125, 1925.
[2]) Ebendaselbst **172**, 411, 1926.

1. Versuch mit Hühnereiweiß ohne Pepsinverdauung.

a) 75 ccm Stärkelösung
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pankreatin
50 ccm Wasser.

c) 2 g Hühnereiweiß
30 ccm Wasser.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu		Proz. Maltose	
	I	II	I	II
1/4	9,4	9,1	54,3	52,4
1 1/2	11,4	11,3	66,0	64,9
3	13,5	13,2	78,1	76,3
5	13,6	13,6	75,3	74,9
7	14,0	14,1	80,6	81,4
24	13,6	14,0	79,9	80,6

2. Versuch mit pepsinverdautem Hühnereiweiß.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.

c) 2 g Hühnereiweiß,
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$.
30 „ Wasser.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu		Proz. Maltose	
	I	II	I	II
1/4	9,5	11,0	54,2	63,4
1 1/2	11,1	12,4	64,0	71,5
3	13,2	14,9	76,1	87,9
5	13,0	15,8	75,0	91,1
7	13,3	17,1	76,8	98,6

3. Versuch mit pepsinverdautem Eieralbumin, Blutalbumin und Serumalbumin.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.

c) 2 g Eieralbumin (krist.),
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

d) 2 g Blutalbumin,
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

e) 20 ccm Serumalbumin,
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

I. 20 ccm a
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

III. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ d,
20 „ Wasser.

IV. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ e,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu				Proz. Maltose			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1/4	8,8	9,5	9,9	9,4	50,6	55,0	57,5	54,3
1 1/2	9,9	12,2	12,9	12,0	57,6	70,4	74,4	69,3
3	12,0	13,9	14,6	14,2	69,3	79,9	84,5	82,1
5	13,2	16,2	17,0	16,5	74,5	93,1	98,2	95,3
7	13,5	15,5	14,9	14,5	77,7	89,1	86,2	83,6
24	13,4	12,0	12,6	13,0	77,0	68,9	74,8	72,6

4. Versuch mit pepsinverdautem Myosin und Myogen.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.

c) 2 g Myosin (nach *Weber*),
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

d) 20 ccm Myogen (nach *Weber*),
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

III. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ d,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu			Proz. Maltose		
	I	II	III	I	II	III
1/4	9,1	10,7	10,1	52,4	61,6	57,9
1 1/2	9,9	12,7	12,6	57,1	73,3	72,6
3	12,1	14,2	13,7	69,7	81,7	78,8
5	13,5	16,9	15,6	77,7	97,1	89,8
7	13,7	17,2	17,0	78,8	99,0	98,2
24	13,8	13,0	12,5	79,6	75,2	72,2

5. Versuch mit Hefekomplement im Vergleich zu pepsinverdautem Hühnereiweiß, Eieralbumin und Myosin.

a) 150 ccm Stärkelösung,
20 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 4 g Pankreatin,
100 ccm Wasser.

c) 10 g Hefe mit
50 ccm Toluol und
50 „ Wasser verrieben.

d) 2 g Hühnereiweiß,
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

e) 2 g Eieralbumin,
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

f) 2 g Myosin (nach *Weber*),
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

III. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ d,
20 „ Wasser.

IV. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ e,
20 „ Wasser.

V. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ f,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu					Proz. Maltose				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
1/2	10,1	9,9	12,5	11,8	12,8	57,9	56,8	71,9	68,2	74,1
1 1/2	11,8	11,2	13,3	14,6	15,0	67,8	64,5	76,6	84,3	86,5
3	13,7	13,2	14,1	15,8	16,5	78,8	75,8	81,4	91,2	94,9
5	13,7	13,7	14,9	16,8	17,2	78,8	79,2	86,1	96,8	99,0
7	13,8	14,4	13,4	13,9	16,0	79,6	83,2	77,7	79,9	92,4
24	13,7	17,2	11,9	12,3	11,3	78,8	99,3	68,6	72,8	65,3

6. Versuch mit pepsinverdautem Hefekomplement.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.

c) 5 g Hefe, mit
25 ccm Toluol und
25 „ Wasser verrieben, dazu
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

III. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu			Proz. Maltose		
	I	II	III	I	II	III
1/4	9,4	10,4	10,7	54,3	59,8	61,6
1 1/2	11,5	12,6	12,4	66,0	72,6	71,5
3	13,5	15,0	15,3	78,1	86,5	88,0
5	13,7	15,8	16,2	78,8	90,9	93,1
7	14,0	16,5	16,9	80,6	95,3	97,1
24	13,9	17,2	17,3	79,9	99,0	99,7

7. Versuch mit pepsinverdautem Eieralbumin und Serumalbumin und Peptos ex albumine bei Anwendung von Malzauszug als Amylase.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) dialysierter Malzauszug.

c) 2 g Eieralbumin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser,
0,5 g Pepsin.

d) 2 g Serumalbumin,
30 ccm Wasser,
2 „ Puffer $p_H = 2$,
0,5 g Pepsin.

e) 2 g Pepton ex albumine,
30 ccm Wasser.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

III. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ d,
20 „ Wasser.

IV. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ e,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu				Proz. Maltose			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1/4	7,8	8,7	8,5	4,9	44,7	50,2	49,0	28,4
1 1/2	9,6	10,5	10,7	5,7	55,3	60,5	61,8	32,7
3	10,6	12,1	12,3	6,7	60,9	69,8	70,8	38,6
5	11,8	13,3	13,8	7,3	68,2	76,7	79,4	42,2
7	12,7	14,5	15,4	8,0	73,8	83,4	88,9	45,8
24	12,8	16,9	17,3	9,1	74,0	97,2	99,8	52,3

8. Versuch mit pepsinverdauter Gelatine.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.

c) 2 g Gelatine,
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu		Proz. Maltose	
	I	II	I	II
1/4	9,4	9,2	54,3	53,2
3	14,3	14,0	82,5	80,7
5	14,6	14,6	84,3	84,3
7	14,5	14,4	83,6	83,2
24	14,6	14,8	84,3	85,0

9. Versuch mit pepsinverdautem Casein.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.

c) 2 g Casein,
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu		Proz. Maltose	
	I	II	I	II
1/4	9,9	8,1	57,2	46,9
1 1/2	11,4	8,5	66,0	49,1
3	14,3	9,9	82,5	57,2
5	14,5	10,5	83,6	60,5
7	14,6	11,1	84,3	63,8
24	14,9	10,8	86,1	62,3

10. Versuch mit pepsinverdautem Elastin.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.

c) 2 g Elastin,
1 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu		Proz. Maltose	
	I	II	I	II
1/4	9,2	9,0	53,2	52,1
1 1/2	11,2	10,8	64,5	62,3
3	13,7	13,9	78,8	79,9
5	14,3	14,1	82,5	81,4
7	14,2	14,1	81,7	81,4
24	14,8	14,3	85,0	82,5

11. Versuch mit pepsinverdauten Fibrinalbumosen.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.

c) 2 g Fibrinalbumosen,
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

I. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
10 „ c,
20 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu		Proz. Maltose	
	I	II	I	II
1/4	9,8	9,9	56,5	57,2
1 1/2	10,8	10,8	62,3	62,3
3	14,0	14,3	80,6	82,5
5	13,9	14,0	79,9	80,6
7	14,2	14,3	81,7	82,5
24	14,2	14,4	81,7	83,4

12. Versuch mit Pepton ex albumine und Tyrosin.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 ,, Puffer $p_H = 5{,}3$.
b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.
c) 2 g Pepton,
30 ccm Wasser.
d) etwa 1proz. Tyrosinlösung.

I. 20 ccm a,
10 ,, b,
30 ,, Wasser.

II. 20 ccm a,
10 ,, b,
10 ,, c,
20 ,, Wasser.

III. 20 ccm a,
10 ,, b,
10 ,, d,
20 ,, Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu			Proz. Maltose		
	I	II	III	I	II	III
1/4	9,7	—	9,9	55,7	—	56,8
1 1/2	11,3	9,5	11,3	65,3	55,0	65,3
3	13,9	9,2	14,1	80,3	53,2	81,4
5	14,2	9,1	14,3	81,7	52,4	82,5
7	14,3	9,0	14,3	82,5	50,6	82,5
24	14,3	6,7	14,2	82,5	38,5	81,7

18. Versuch mit pepsin-trypsinverdautem Hühnereiweiß und trypsinverdautem Pepton ex albumine.

a) 75 ccm Stärkelösung,
10 ,, Puffer $p_H = 5{,}3$.
b) 2 g Pankreatin,
50 ccm Wasser.
c) 2 g Hühnereiweiß,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
25 ,, Wasser,
0,5 g Pepsin,
Pufferumstellung auf $p_H = 8{,}4$,
0,65 g Pankreatin.
d) 2 g Pepton ex albumine,
2 ccm Puffer $p_H = 8{,}4$,
28 ,, Wasser,
0,65 g Pankreatin.

I. 20 ccm a,
10 ,, b,
30 ,, Wasser.

II. 20 ccm a,
5 ,, b,
10 ,, c,
25 ,, Wasser.

III. 20 ccm a,
5 ,, b,
10 ,, d,
25 ,, Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu			Proz. Maltose		
	I	II	III	I	II	III
1/4	9,4	9,2	7,8	54,3	53,2	45,1
1 1/2	11,6	11,8	9,9	66,7	67,8	57,2
3	13,9	14,1	12,0	79,9	81,0	69,3
5	14,2	14,3	12,4	81,7	82,5	71,5
7	14,5	14,8	12,6	83,9	85,0	72,6
24	14,6	14,8	13,1	84,3	85,0	75,5

14. Einwirkung von pepsinverdautem Casein und Myosin auf Maltose.

a) 75 ccm etwa 1,1 proz. Maltoselösung,
10 ccm Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Casein,
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$.
30 ccm Wasser.

c) 2 g Myosin (nach *Weber*),
0,5 g Pepsin,
2 ccm Puffer $p_H = 2$,
30 „ Wasser.

I. 20 ccm a,
40 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

III. 20 ccm a,
10 „ c,
30 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu			mg Maltose		
	I	II	III	I	II	III
1/4	17,7	17,7	17,5	15,9	15,9	15,8
1 1/2	17,5	17,7	17,4	15,7	15,9	15,7
3	—	16,9	17,0	—	15,2	15,3
5	17,7	16,4	16,8	15,9	14,8	15,1
7	—	16,1	16,2	—	14,5	14,6
24	17,6	15,1	15,6	15,8	13,6	14,0

15. Einwirkung von Pepton und Tyrosin auf Maltose.

a) 75 ccm Maltoselösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Pepton,
30 ccm Wasser.

c) etwa 1 proz. Tyrosinlösung.

I. 20 ccm a,
40 „ Wasser.

II. 20 ccm a,
10 „ b,
30 „ Wasser.

III. 20 ccm a,
10 „ c,
30 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu			mg Maltose		
	I	II	III	I	II	III
1/4	17,6	—	17,7	15,8	—	15,9
1 1/2	—	11,4	17,5	—	10,2	15,7
3	17,7	11,1	17,6	15,9	9,9	15,8
5	—	11,0	17,5	—	9,8	15,7
7	—	11,1	17,4	—	9,9	15,6
24	17,7	11,1	17,5	15,9	9,9	15,7

16. Einwirkung von pepsin-trypsinverdautem Hühnereiweiß und trypsinverdautem Pepton ex albumine auf Maltose.

a) 75 ccm Maltoselösung,
10 „ Puffer $p_H = 5{,}3$.

b) 2 g Hühnereiweiß,
25 ccm Wasser,
2 „ Puffer $p_H = 2$,
0,5 g Pepsin,
Pufferumstellung auf $p_H = 8{,}4$,
0,65 g Pankreatin.

c) 2 g Pepton ex albumine,
28 ccm Wasser,
2 „ Puffer $p_H = 8{,}4$,
0,65 g Pankreatin.

I. 20 ccm a, 40 „ Wasser. II. 20 ccm a, 10 „ b, 30 „ Wasser. III. 20 ccm a, 10 „ c, 30 „ Wasser.

Zeit in Stdn.	mg Cu			mg Maltose		
	I	II	III	I	II	III
1/4	17,6	17,5	13,8	15,9	15,8	12,4
1 1/2	—	17,8	13,6	—	16,0	12,2
3	17,6	17,6	13,3	15,9	15,9	12,0
5	—	17,6	12,9	—	15,9	11,6
7	—	17,5	12,5	—	15,8	11,2
24	17,5	17,7	12,0	15,8	16,0	10,8

Aus unseren Versuchen, besonders aus denjenigen mit Maltose, geht auf das deutlichste hervor, daß die Zucker-Eiweißkondensation nicht etwa auf eine Reaktion zwischen dem ausgeschiedenen Kupferoxydul und den Eiweißabbauprodukten zurückgeführt werden kann. Denn hier war das Kupfer immer die gleiche Kochzeit mit dem Eiweiß in Berührung.

Herrn Prof. *Rona*, dem Vorsteher der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts, wie auch den Herren Dr. *Nicolai* und Dr. *Weber* danken wir für die Darstellung und Überlassung einiger Eiweißpräparate.

Zur Frage des Lichttreibens.

Von

Anneliese Niethammer.

(Mitteilung aus dem elektrotechnischen Institut der Deutschen Technischen Hochschule Prag.)

(Eingegangen am 19. August 1926.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

I.

Bei der großen Bedeutung, die dem Lichte im Haushalt der Natur zukommt, nimmt es wunder, daß bei dem Studium des Ruheproblems der Winterknospen der Lichteinfluß so wenig berücksicht wurde.

Im Jahre 1914 hat *Klebs*[1]) gezeigt, daß die in hartnäckiger Winterruhe trotzenden Knospen der Buche durch Einbringung in den kontinuierlichen Lichtraum jederzeit zur Entfaltung gebracht werden können. Dieser Befund war um so interessanter, als es bis dahin ganz unmöglich war, durch die anderen Treibmittel Buchenknospen zur Entwicklung zu bringen. Ein ähnliches Verhalten wird für Carpinus angegeben. Über die anderen Holzgewächse wird nichts berichtet. Nach den *Klebs*chen Untersuchungen war es nicht unwahrscheinlich, daß andere Knospen ein analoges Verhalten zeigen. Daß dies tatsächlich der Fall ist, konnte Verfasserin vor kurzem bestätigen. *Klebs* ging von seinen Versuchen, trotzdem sie nur die Lichtempfindlichkeit von Carpinus und Fagus bestätigten, gleich einen Schritt weiter und diskutiert den Gedanken, daß der Lichtmangel bei Zustandekommen der Ruhe von Bedeutung sei. Im Jahre 1916 erbringt *Weber*[2]) den Nachweis, daß die Buchenknospen auch durch Acetylendämpfe getrieben werden können und tritt bei dieser Gelegenheit entschieden gegen die *Klebs*sche Ansicht von der Bedeutung des Lichts bei Zustandekommen und Aufhören der Ruheperiode ein.

Merkwürdigerweise schien damit die ganze Angelegenheit beendigt. Über den Lichteinfluß auf ruhende Knospen wurde nicht weiter gearbeitet, man beschränkte sich damit, anzugeben, daß Licht für Buchen ein Frühtreibemittel ist, ohne jemals weiter zu forschen. Auch bei der Anwendung der verschiedenen Treibmittel kümmerte man sich nie um den Lichteinfluß.

In einer im Jahre 1925 erschienenen Abhandlung[3]) konnte Verfasserin bereits zeigen, daß die Lichtempfindlichkeit ruhender Knospen verbreiteter ist, als es die spärlichen einschlägigen Veröffentlichungen vermuten ließen. Über die Literatur bis 1925 ist dort ausführlich

---

[1]) *G. Klebs*, Abhandlung der Akademie der Wiss., Heidelberg. Naturw. math. Kl. 1914.

[2]) *F. Weber*, Ber. d. deutsch. Bot. Ges. **34**, 7, 1916.

[3]) *Anneliese Niethammer*, diese Zeitschr. **138**, 278, 1925.

berichtet. Aus dem Jahre 1926 ist die Arbeit von *Jacobi*[1]) zu erwähnen, in der unter anderem berichtet wird, daß die Knospen von Syringa vulgaris durch kontinuierliche Verdunkelung am Austreiben verhindert werden. Bemerkenswert ist, daß die Praxis den günstigen Einfluß des Lichtes bereits kennt und in Amerika sich beispielsweise bei der Treiberei der verschiedensten Blütenpflanzen im Winter zunutze macht.

Meine im Jahre 1925 veröffentlichten Untersuchungen über das Lichttreiben bedurften vielfach noch einer Erweiterung, die nun durch die im Winter 1925 und 1926 ausgeführten Versuche erbracht werden kann.

Zunächst mußte ganz allgemein das Verhalten möglichst *verschiedener* Gewächse im elektrischen Lichtraum studiert werden, um zu prüfen, ob die Lichtempfindlichkeit allgemein ist und ob sie sich bei allen Knospen in gleichem Grade nachweisen läßt. Interessant ist es auch, festzustellen, ob sich vielleicht eine Analogie zu den Licht- und Dunkelkeimern der Samen erbringen läßt. Ferner wurde der Lichteinfluß auf warm gebadete Knospen studiert.

In zweiter Linie war dann die Möglichkeit der Verstärkung dieser natürlichen Lichtempfindlichkeit zu berücksichtigen. Daß dies durch fluoreszierende Farbstoffe und gewisse Metallsalze, die als *Lichtkatalysatoren* bekannt sind, möglich ist, konnte bereits früher gezeigt werden (l. c.). Es lag nahe, zwei natürlich im Pflanzenreich vorkommende fluoreszierende Farbstoffe, von denen besonders dem einen fundamentale Bedeutung zukommt, zu prüfen. Es ist das das Chlorophyll und das Äsculin. Von metallischen Lichtkatalysatoren war die Prüfung des Mangans, das von *Neuberg*[2]) auch unter diese Klasse gezählt wird, ausständig. Ferner wurde noch die Eisenwirkung, die möglicherweise bei der frühtreibenden Wirkung *Knop*scher Nährlösung eine Rolle spielt, näher ins Auge gefaßt.

Die hier mitgeteilten Versuche wurden zum großen Teile im elektrotechnischen Institut der Prager Deutschen Technischen Hochschule ausgeführt, und bin ich dem Vorstande dieses Instituts, Professor Dr. *F. Niethammer*, für die Erlaubnis zur Durchführung der umfangreichen Versuchsserien zu großem Danke verpflichtet.

II. Methodik.

Als Versuchsmaterial dienten, wie früher, abgeschnittene Zweige in einer Länge von 60 cm; frühere Erfahrungen hatten bereits gelehrt, daß längere Zweige keinen Vorteil bieten. Die Zahl der Zweige für den einzelnen Versuch schwankte, jedenfalls ist es gut, mit reichlichem Material zu arbeiten, da sich die Zweige und Knospen selbst eines Individuums oft sehr verschieden verhalten. Leider verbot der beschränkte Raum die Anwendung

[1]) *Helene Jacobi*, Österr. Zeitschr. f. Bot. **75**, 29, 1926.

[2]) *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **18**, 305; **17**, 270; **27**, 271; **29**, 279; **39** 153,; **44**, 495.

von zu großen Versuchsserien, so daß je nach der Größe des Versuchs vier bis 10 Zweige pro Parallelversuch verwendet wurden. Jedenfalls wurden nur Zweige eines Versuchsobjekts zu einem Versuch herangezogen. Zum Treiben wurden die Zweige in Gläser mit Leitungswasser eingestellt. Für die Treibversuche im elektrischen Lichtraum diente abermals eine gewöhnliche Holzkiste von 1,2 m Höhe, auf die oben der Deckel lose aufgelegt wurde. In der Mitte des Deckels war eine kreisförmige Öffnung, durch die die elektrische Glühbirne (Halbwatt Nitra 300 HK mittlerer sphärischer Intensität) zur Hälfte eingeführt wurde. Die Beleuchtungsintensität im Bereiche der obersten Knospen kam etwa 5000 Lux gleich, was schwachem Sonnenschein in der Natur entspricht. Die Innenwände der Kiste wurden mit Leinwandlappen ausgespannt, die täglich gut befeuchtet wurden, um den Treibraum einigermaßen feucht zu halten. Der Boden war mit Sägespänen ausgefüllt, die gleichfalls täglich befeuchtet wurden. Trotzdem mußte im Kulturraum ein steter Kampf gegen Trockenheit geführt werden, der durch tägliches reichliches Spritzen der Pflanzen einigermaßen erleichtert wurde. Die Temperatur in der Kiste im Umkreis der Knospen schwankte zwischen 22 und 28° C. Am Boden der Kiste war die Temperatur stets um etwa 2° niedriger. Die Abdunklung im Lichtraum für die verdunkelten Serien erfolgte durch Blechzylinder.

Der zweite Teil der Versuche wurde im Gewächshaus des pflanzenphysiologischen Instituts angeordnet. Die Zweige wurden dicht an die Glasfenster des Gewächshauses (Westseite) gestellt, um ihnen von dem spärlichen Winterlicht möglichst viel zukommen zu lassen.

Die Temperatur daselbst schwankte zwischen 17 und 24°.

III. Versuche.

1. *Allgemeines über die Lichtempfindlichkeit ruhender Knospen.*

Die hier mitgeteilten Auszüge der Versuchsprotokolle lassen erkennen, daß *alle* hier geprüften Gewächse während ihrer winterlichen Ruhezeit lichtempfindlich sind. Der *Grad* dieser Lichtempfindlichkeit ist allerdings sehr verschieden. Der Zeitpunkt oder besser das Stadium der Ruheperiode spielt wie bei allen Treibverfahren auch hier eine Rolle. In der tiefsten Ruhe ist es unmöglich, die unbelichteten Knospen zur Entfaltung zu bringen, im Stadium der ausklingenden Ruhe wird es immer leichter, die Dunkelversuche zum Treiben zu bringen. Bei dieser Gelegenheit darf nicht unerwähnt bleiben, daß der Rhythmus der Ruheperiode natürlich unverändert ist, daß aber der genaue Zeitpunkt des Eintretens und Ausklingens der Ruheperiode sehr verschieden ist, je nach dem Jahr.

Auszug des Versuchsprotokolls.

Innerhalb der gewählten Versuchszeiten kamen im Dunkeln überhaupt nicht zur Entwicklung: Fagus silvatica (Dezember/Januar), Tilia parvifloris (Dezember/Januar), Coryllus, Blatt und Blüte (November/Dezember), Acer plat. (Dezember/Januar), Juglans regia (Januar/Februar), Betula verrucosa (Oktober/November) Blatt und Blüte. *Im Lichtraum* gelang es, in der gleichen Zeit Blatt- bzw. Blütenbildung zu erzielen.

Besonders überraschend war der Einfluß des Lichtes auf die Knospen von Acer plat., die bekanntlich im Dezember noch in *tiefer* Ruhe verharren und im Lichtraum nach 10 Tagen bereits die Entwicklung begannen.

Weder Licht noch Dunkel trieben die Knospen von Fraxinus aus.

Innerhalb der Versuchszeit zeigten gelegentlich im Dunkeln ein leichtes Austreiben: Syringa vulgaris, Cornus sanguinea, Aesculus hypocastanum und Forsythia susp.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse systematisch zusammengefaßt.

Versuchspflanze	Versuchs-beginn	Versuchs-ende	Entwicklungsverlauf im Licht	Entwicklungsverlauf im Dunkeln
Aesculus hypoc.	4. XI.	8. I.	22. XII. Blätter entfaltet	1. I. eine Knospe angetrieben 8. I. unverändert
Magnolie . . .	5. X.	22. X.	19. X. zwei Blüten entfaltet; 22. X. 2 weitere entfaltet	Keine Entwicklung
Fagus silv. . .	18. XII.	5. II.	21. I. Blätter	„ „
Carpinus . . .	18. XII.	6. I.	29. XII. „	„ „
Acer plat. . . .	9. XII.	14. I.	28. XII. „	„ „
Tilia parv. . .	9. XII.	14. I.	7. I. „	„ „
Coryllus	18. XII.		2. I. „	„ „
Juglans regia .	15. I.	15. II.	15. II. 50 Proz. der Zweige Blätter	„ „
Syringa vulg. .	2. X.	7. X.	4. X. Blätter (s. Abb. 1)	4. X. angetrieben
Syringa	0. X.	21. IX.	21. X. Entfaltung	Keine Entwicklung
Forsythia s. . .	12. X.	2. XI.	18. X. „	18. X. angetrieben, lange Triebe 2. XI. keine Veränd.
Cornus sang. .	2. X.	18. X.	18. X. Blättchen	18. X. Treiben
Betula ver. . .	19. X.	2. XI.	2. XI. „ 21. X. Blüten verstäubt	Keine Entwicklung

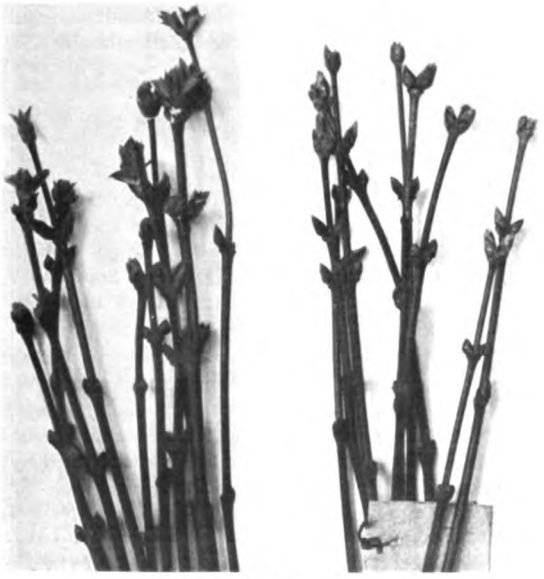


Abb. 1.

Zu der Tabelle ist im einzelnen noch zu bemerken, daß die Blätter von Coryllus mit keinem *anderen* Treibmittel aus der Ruhe erweckt werden konnten, erst durch kontinuierliche Belichtung gelang es, ähnlich wie bei der Buche die Ruhe zu brechen. Acer, Tilia und Fagus sind um die hier angegebene Zeit mit den bekannten Treibmitteln auch nicht leicht aus der Ruhe zu bringen. Gerade bei diesen schwer treibbaren Gewächsen macht sich der Lichteinfluß besonders geltend, da im *Dunkeln* jede Spur von Entwicklung unterbleibt. Die Versuche mit Magnolien zeigen, daß die Blüten dieser Pflanze sehr leicht zur vollen Entwicklung gebracht werden können, das gleiche gilt von den Birkenknospen. Je leichter treibbar die Pflanzen sind, wie Flieder, Forsythia, Kastanie und Cornus, um so leichter ist auch im Dunkeln eine geringe Entwicklung zu erzielen, die aber nie weiter fortschreitet.

Auf Grund dieser Erfahrungen ist man berechtigt, die Ergebnisse wie folgt zusammenzufassen:

Je „schwerer" treibbar die Pflanze an und für sich, um so stärker der Lichteinfluß, je leichter treibbar, um so schwächer der Lichteinfluß.

In allen hier angeführten Fällen waren die Pflanzen während der ganzen Versuchszeit ununterbrochen im elektrischen Lichtraum.

Prüfung des Einflusses einer Vorbelichtung bei nachträglicher Verdunklung.

Syringa vulgaris.

Je Parallelversuch wurden fünf Zweige genommen. Partie a) bleibt stets am Lichte, Partie b) wird 72 Stunden dem Lichte ausgesetzt und dann verdunkelt, Partie c) wird die ganze Zeit verdunkelt gehalten, Partie d) wird 3 Tage verdunkelt und dann dem Lichte ausgesetzt.

Ergebnisse: Beginn 8. Oktober; 21. Oktober a) und d) Entfaltung, c) und b) unverändert.

Eine Wiederholung des Versuchs bringt dasselbe Ergebnis, nämlich, daß nur die *kontinuierliche* Beleuchtung die frühtreibende Wirkung auslöst.

Aesculus hypocastanum.

Die Versuchsanordnung ist wie oben. Auch hier wirkt nur die kontinuierliche Beleuchtung frühtreibend.

Im Gegensatz zu den Lichtsamen, wo beispielsweise nach *Lehmann* bei Lythrium salicaria[1]) schon wenige Minuten, sogar Sekunden Beleuchtung bei nachträglicher Verdunklung die Keimung ermöglichen, ist bei den Winterknospen zur Einleitung der Treibvorgänge kontinuierliche Beleuchtung nötig. Der Grad der Lichtempfindlichkeit bei Winterknospen ist verschieden ausgeprägt, in dieser Hinsicht ist also ein Übergang zu Dunkel- und Lichtsamen zu finden.

Lichteinfluß bei einem bekannten Treibmittel, wie es das Warmbad ist.

Daß auch bei dem Warmbad der Lichteinfluß nicht ganz bedeutungslos ist, wird schon von *Molisch* erwähnt[2]). Ein Versuch mit Syringa vulgaris spricht auch hier deutlich für den Einfluß des Lichtes.

---

[1]) *E. Lehmann*, Ber. d. deutsch. Bot. Ges. **36**, 157, 1918.

[2]) *Hans Molisch*, Sitzungsber. d. Wien. Akad. math.-naturw. Kl. **171**, 1908; **118**, 1909.

Vier Bündel von Fliederzweigen wurden 9 Stunden in Wasser von 32° warm gebadet und dann je zu einem Teil im Gewächshaus licht und dunkel und zum anderen Teil in der elektrisch beleuchteten Kiste licht und dunkel zum Treiben gestellt.

Versuchsbeginn: 10. Oktiober. 27. Oktober im Lichtraum voll entfaltet, dunkel, treibt sehr gut. Siehe Abb. 2.

Abb. 2.

Im Glashaus bei normaler Belichtung Entfaltung am 5. November, auch hier im Licht besser entwickelt, aber im elektrischen Lichtraum ist der Unterschied viel ausgeprägter. Vor allem wird durch die künstliche Beleuchtung die Entwicklung der Blütenstände begünstigt, wie es auch aus der Abbildung hervorgeht.

Im Anschluß an diese Versuche, die sich allgemein mit der Lichtempfindlichkeit ruhender Knospen beschäftigten, soll auf den Einfluß der beiden in der Natur verbreiteten Lichtkatalysatoren eingegangen werden.

2. Versuche mit Äsculinlösungen. (Stets im elektrischen Lichtraum.)

Äsculin kommt in der Natur als Begleiter der Kastanie vor und ist durch seine bläuliche Fluoreszenz bekannt. Es äußert nach *Neuberg und Mitarbeitern* gleich anderen fluoreszierenden Farbstoffen verschiedene, den Metallsalzen vergleichbare, durch chemische Reaktionen nachweisbare photokatalytische Effekte[1]). Hier gelangte stets ein Original-*Merck*-Äsculin zur Anwendung. Die Farbstofflösung wurde teils mit einer kleinen Rekordspritze in die Knospen eingespritzt, teils wurden die Zweige in den Lösungen

[1]) *C. Neuberg* und *Galambos*, diese Zeitschr. **61**, 315, 1914; *C. Neuberg* und *E. Schwenk*, ebendaselbst **71**, 219, 1915.

im dunkeln Raume gebadet. Das Bad erfolgte in großen Glaszylindern und bei Zimmertemperatur.

Die Versuchsergebnisse sind der Übersicht halber in einer Tabelle vereinigt.

Versuchsobjekt: *Syringa vulgaris.*

Nr.	Art der Einbringung	Versuchsbeginn	Entwicklungsverlauf im Licht		Entwicklungsverlauf im Dunkeln	
1	Injektion	2. X.	Äsculin 1 : 10000 18. X. treibt 2. X. Entfaltung, vor allem der Blüten	Wasser unverändert treibt gut	Äsculin 1 : 10000 unverändert „	Wasser
2	Bad. Knospenschuppen entfernt	13. XI.	Äsculin : 2,000 Kein nennenswerter Unterschied in der Entwicklung, nur die Blütenstandsentwicklung wird begünstigt	Wasser	Äsculin 1 : 2000 Keine Entwickl.	Wasser
3	Injektion	5. XI.	Äsculin 1 : 10000 19. XI. treibt gut 3. XII. Entfalt.	Wasser 1 Knospe treibt treibt gut	Äsculin 1 : 10000 Keine Entwickl.	Wasser
4	„	7. XI.	Äsculin 1 : 5000 27. XI. Entfalt.	Wasser treibt	Äsculin 1 : 5000 1 Knospe angetrieben	Wasser nichts
5	„	19. XI.	Äsculin 1 : 5000 29. XI. spreizt 3. XII. treibt 6. XII. Entfalt.	Wasser nichts 1 Knospe treibt 1 Knospe treibt, sonst Ruhe	Äsculin 1 : 5000 nichts „	Wasser

Äsculinlösungen 1 : 5000 und 1 : 10000 in die Knospen von Syringa im Monat November injiziert, üben einen frühtreibenden Einfluß aus, die Vorsprünge sind nicht groß, aber deutlich sichtbar. Die Vorsprünge treten nur bei den belichteten Serien auf. Bei den Badeversuchen ist der Einfluß des Äsculins sehr bescheiden, wahrscheinlich wurde nicht die günstigste Konzentration gewählt. Die Wirkungsweise des Äsculins kann also der der früher geprüften Lichtkatalysatoren wie Eosin, Methylenblau und Ferrisulfat an die Seite gestellt werden (l. c.).

3. Über den Einfluß verschiedener Chlorophyllösungen.

Nachdem es bekannt war, daß die verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffe, wie Eosin und Methylenblau die natürliche Lichtempfindlichkeit der Winterknospen verstärken und entwicklungsbeschleunigend wirken, lag es nahe, den bekanntesten natürlichen fluoreszierenden Farbstoff aus dem Pflanzenreich zu Anologieversuchen heranzuziehen. *Chlorophyll* wurde wiederholt mit den bekannten fluoreszierenden Farbstoffen verglichen, um auf diese Weise seine Wirkungsweise im intakten Chloroplasten, wo es den Untersuchungen von *Stern*[1]) zufolge auch fluoresziert, aufzuhellen. Tatsächlich ist es *Noack*[2]) gelungen, in vitro eine weitgehende Übereinstimmung zwischen Chlorophyllauszügen und den bekannten fluoreszierenden Farbstoffen, wie z. B. Eosin, zu finden. Daß Chlorophyll die typischen photo-

[1]) *K. Stern*, Zeitschr. f. Bot. **13**, 193, 1921.

[2]) *K. Noak*, ebendaselbst **17**, 481, 1925.

dynamischen Erscheinungen im Sinne *Tappeiners*[1]) auslöst, ist schon früher von *Hausmann*[2]) festgestellt worden. Nach dem Gesagten erscheint es nicht unwahrscheinlich, auch in unserem Falle eine übereinstimmende Wirkung zu finden.

Die Chlorophyllextrakte wurden aus dem getrockneten Mehl von Brennnesselblättern hergestellt, und zwar wurde wie folgt vorgegangen: 10 g Brennnesselpulver wurden mit 200 ccm 96proz. Alkohol extrahiert, von dieser intensiv kirschrot fluoreszierenden Lösung wurden 10 ccm mit 90 ccm Wasser verdünnt.

Da nach *Jesenko*[3]) Alkohol selbst frühtreibend wirkt, mußten als Kontrollen in unserem Falle nicht nur Wasser, sondern auch Alkohol herangezogen werden. 1- bis 10proz. Dosen wirken nach *Jesenkos* Angaben günstig. Höhere Gaben haben bald letale Wirkung. Wir wählten etwa 10proz. Alkohol, indem wir von unserem Alkohol (etwa 96 proz.) 10 ccm mit 90 ccm destilliertem Wasser verdünnten. Analog wurden 10 ccm der Chlorophyllösung, die in konzentriertem Alkohol hergestellt wurde, mit 90 ccm Wasser versetzt.

Versuchsergebnisse. *Syringa vulgaris*, Stets im elektrischen Lichtraum. Versuchsbeginn 24. Oktober. Art der Einbringung: Injektion.

Sechs Partien von Zweigen. a) wird mit destilliertem Wasser injiziert; b) mit Alkohol und c) mit der Chlorophyllösung; d), e) und f), wie a), b) und c).

a), b), c) werden in den elektrischen Lichtraum gestellt, d), e) und f) werden verdunkelt.

2. November. Chlorophyll licht, c) Entfaltung, a) und b) treiben, wobei b) besser ist als a). d) und e) ganz schwach angetrieben, d) eine Blütenknospe angetrieben (s. Abb. 3).

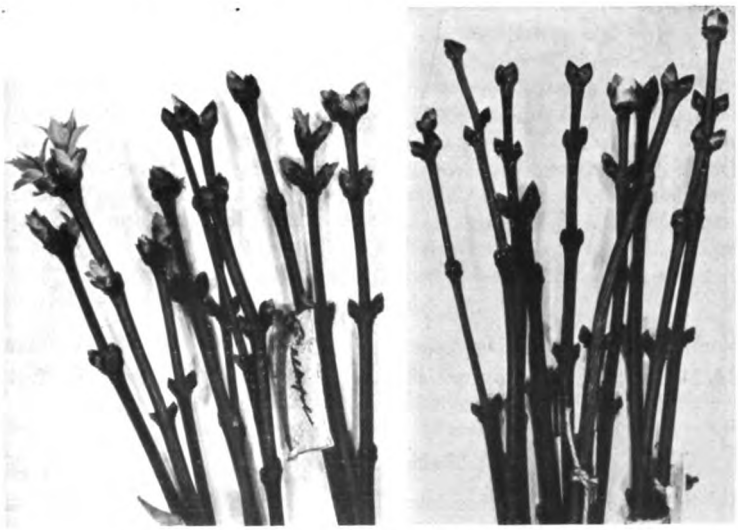


Abb. 3.

[1]) *H. v. Tappeiner*, Ergebn. d. Physiol. *Asher* und *Spiro* 8, 698, 1909.
[2]) *W. Hausmann*, Jahrb. f. wiss. Bot. **46**, 599, 1909.
[3]) *Jesenko*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **29**, 273, 1911.

Am 11. und 19. November wird dieser Versuch wiederholt, bei der Lichtreihe ist das Ergebnis dasselbe, in der Dunkelreihe ist es insofern anders, als überhaupt keine Entwicklung eintritt.

Tilia parvifloris.

Versuchsbeginn am 7. November. Elektrischer Lichtraum. Abermals sechs Partien von Zweigen, die Anordnung ist wie bei Syringa vulgaris.

24. Dezember. Wasser eine Knospe treibt. Alkohol dasselbe. Chlorophyll drei Terminalknospen treiben. Im Dunkeln allgemein keine Entwicklung.

28. Dezember. Wasser an der Entfaltung. Alkohol dasselbe. Chlorophyll Blättchen. Im Dunkeln keinerlei Entwicklung.

Lonicera.

Art der Einbringung: Bad. Gewächshaus. Versuchsbeginn: 21. November. Die Versuchsanordnung ist wieder dieselbe wie bei Syringa.

2. Dezember. Wasser nichts. Alkohol treibt. Chlorophyll treibt sehr gut. Im Dunkeln keinerlei Entwicklung.

4. Dezember. Wasser Entfaltung. Alkohol dasselbe. Chlorophyll Blättchen. Im Dunkeln keinerlei Entwicklung.

Dieser kleine Versuch zeigt uns erstens, daß auch dem schwachen Lichte im Gewächshaus eine Bedeutung zukommt, da die Abdunklung der Zweige die Entwicklung gänzlich unterband. Ferner können wir beobachten, daß auch bei geringen Lichtintensitäten der Einfluß des Chlorophylls, wenn auch nur schwach, aber doch deutlich zutage tritt.

Diese drei Versuche, die alle zeigen, daß durch geringe Chlorophyllgaben, die Entwicklung im *Lichte* beschleunigt wird, sind alle mit einem ungereinigten Rohchlorophyll ausgeführt, und es kann der Einwand erhoben werden, daß irgendwelche Begleitstoffe für den Treiberfolg verantwortlich sind.

Der Güte von Herrn Professor Dr. *Boresch*, Tetschen-Liebwerd, verdankte ich eine kleine Menge reines Chlorophyll, das nach *Willstätters* Vorschriften hergestellt wurde. Von diesem Präparat stellte ich mir eine Chlorophyllösung 1 : 10000 in etwa 10proz. Alkohol her.

Syringa vulgaris.

Versuchsbeginn: 17. Dezember. Injektion. Elektrischer Lichtraum.

24. Dezember. Chlorophyll Blätter. Alkohol beginnt die Entfaltung. Wasser treibt gut. Im Dunkeln keine Entwicklung.

Tilia parvifloris.

Versuchsbeginn: 9. Dezember. Injektion. Elektrischer Lichtraum.

24. Dezember. Chlorophyll: einzelne Terminalknospen treiben. Wasser nichts. Alkohol nichts.

28. Dezember. Chlorophyll: viele Knospen treiben, zwei Terminalknospen, Blätter. Wasser: eine Knospe, ein Blatt, sonst Ruhe. Alkohol: nichts.

7. Januar. Chlorophyll: Blätter. Alkohol nichts. Wasser ein Blatt, sonst Ruhe. Im Dunkeln keine Entwicklung.

Acer platanoides.

Versuchsdauer vom 9. bis 28. Dezember. 28. Dezember alles Blättchen. Durch die Chlorophyllinjektion wurde hier *kein* Vorsprung in der Entwicklung erzielt.

Fagus silvatica.

Versuchsbeginn: 18. Dezember. Bad. Elektrischer Lichtraum.

14. Januar. Chlorophyll: Blätter. Alkohol nichts. Wasser nichts. Im Dunkeln keine Entwicklung.

17. Januar. Alkohol beginnt zu treiben. Wasser nichts.

Auch die Versuche mit reinem Chlorophyll lassen die den Treiberfolg begünstigende Wirkung erkennen. Am stärksten ist dies bei der Buche zu sehen. Weniger stark, aber dennoch deutlich ist die Stimulation bei Syringa und Tilia zu sehen. Nur bei Acer war kein Einfluß zu verzeichnen.

Diese wenigen Versuche genügten uns aber vorläufig, denn sie zeigen, daß durch Chlorophyllösungen die natürliche Lichtempfindlichkeit der Winterknospen, ebenso wie durch die bekannten fluoreszierenden Farbstoffe, verstärkt werden kann. Bei den reinen Chlorophyllösungen wurde stets die Konzentration 1 : 10000 angewendet, dieselbe Konzentrationsstufe erwies sich auch bei den früheren Treibversuchen als optimal (l. c.).

Diese Untersuchungen bieten einen neuen Beweis dafür, daß in vitro die Wirkungsweise bekannter fluoreszierender Farbstoffe und eines alkoholischen Chlorophyllauszugs *dieselbe ist.*

4. Der Einfluß von Manganosalzen.

Bereits von *Popoff*[1]) wird über einen frühtreibenden Einfluß der Mangansalze berichtet. Auf die Eigentümlichkeit des Mangans als schwacher Lichtkatalysator hat er aber dabei nicht geachtet. Uns kam es darauf an, bei der frühtreibenden Wirkung des Mangans vor allem auch das Verhalten in Licht und Dunkel zu studieren.

Die Manganoverbindungen wurden stets als Original-*Merck*-Präparat verwendet, und die Einbringung in die Knospen erfolgte mittels Injektion und Bad. Die meisten Versuche wurden aus Raummangel im elektrischen Lichtraum ins Glashaus verlegt.

Syringa vulgaris.

A. Art der Einbringung: Bad.

Nr.	Versuchsbeginn	Versuchsschluß	Konz. Proz.	Dauer Stdn.	Entwicklung im Licht	Entwicklung im Dunkeln
1	28. IX. Knospen entschuppt	18. XI.	0,5	6	Entwickeln sich ziemlich gleich. Blattentwicklung ist in beiden Fällen nicht zu erzielen	Keine Entwicklung

[1]) *Popoff*, Biol. Centralbl. 43, 1923.

Nr.	Versuchsbeginn	Versuchsschluß	Konz. Proz.	Dauer Stdn.	Entwicklung im Licht		Entwicklung im Dunkeln
					Wasser	Mangansulfat	
2	28. IX. Knospen entschuppt	21. X.	0,5	13	26. IX. nichts 28. IX. 3 Seitenknospen beginnen 6. X. treibt sehr gut 8. X. Seitenkn. Blätter. Terminal unverändert in Ruhe 21. X. Terminalknospen immer noch in Ruhe	treibt fast alle Kn. treiben Blättchen alle Terminalknospen Blätter	
3	28. IX.	30. XI.	2	16	15. X. nichts 28. XI. nichts 30. XI. unverändert	treibt entfaltet sich unverändert	Nichts

Bei Versuchsbeginn im September glückt es, bei entsprechender Einwirkungszeit mit 2proz. Manganosulfatlösungen die Knospen zu früherem Austreiben zu bringen. 0,5proz. Lösungen wirken bereits schwächer. Im Dunkeln unterbleibt die Entwicklung völlig.

Im November und Dezember ist die Einwirkung ½proz. Lösungen ganz unscheinbar. Im Dunkeln unterbleibt aber auch hier bei Wasser- und Manganpflanzen die Entwicklung.

B. Art der Einbringung: Injektion.

Versuchsbeginn: 1. Dezember. Konzentration 4proz. Manganosulfat- und Chlorid.

7. Dezember. Sulfat beginnt. Chlorid und Wasser in Ruhe.

9. Dezember. Sulfat beginnt die Entfaltung. Wasser treibt gut. Chlorid in Ruhe.

16. Dezember. Sulfat: Blätter. Wasser beginnt die Entfaltung. Chlorid treibt gut, aber sichtlich zurück.

Am 16. Dezember treiben im Dunkeln von den Wasserkontrollen vereinzelte Knospen; bei den Manganpflanzen treibt je eine Pflanze.

Die 4proz. Injektion von Manganosulfat übt im Dezember einen schwachen, aber deutlichen Einfluß aus, Manganchlorid der gleichen Konzentration hemmt die Entwicklung zunächst.

Zusammenfassend kann man den Versuchen an Syringa entnehmen, daß Mangan auch einen Frühtreiberfolg auslöst, vorausgesetzt, daß die richtige Konzentration und Verbindung gewählt wird. Der Erfolg ist auch hier nur am *Lichte* zu sehen, trotzdem nur das schwache Glashauslicht in Frage kam. Die Wirkung ist also den früher besprochenen (l. c.) metallischen Lichtkatalysatoren an die Seite zu stellen.

Im Anschluß sind noch zwei Versuche im elektrischen Lichtraum zu besprechen, der Unterschied zwischen Wasser- und Manganpflanzen ist hier viel größer als bei den Versuchen im Treibhaus bei normaler Beleuchtung.

1. Injektion der Knospen von Syringa vulgaris.

Versuchsbeginn: 8. Oktober. Mangansulfat und Manganchlorid je 2proz.

11. Oktober. Manganchlorid treibt, Wasser und Sulfat in Ruhe.

12. Oktober. Sulfat beginnt zu treiben, sonst unverändert.

22. Oktober. Mangansulfat geht an die Entfaltung, anderes wie früher.

23. Oktober. Wasser treibt auch, sonst gleich.

29. Oktober. Chlorid geht auch an die Entfaltung, desgleichen Wasser.

2. November. Der Unterschied hat sich bereits verwischt, alle drei sind gleich entwickelt.

Im Dunkeln unterbleibt in der Versuchszeit die Entwicklung.

2. Badeversuch in Mangansulfat.

Versuchsbeginn: 13. Oktober. Konzentration: 5proz. Dauer: 15 Stunden.

20. Oktober. Mangansulfat treibt, Wasser in Ruhe.

2. November. Mangansulfat licht, geht an die Entfaltung, Wasser treibt gut.

Im Dunklen tritt in gleicher Zeit keine Entwicklung auf.

Auch eine ganze Reihe anderer Gewächse läßt sich durch Mangansalze treiben; der Einfluß ist meistens schwach, aber doch erkennbar. Gelegentlich treiben bei den Kontrollpflanzen unten an den Schnittflächen die Knospen zeitig aus, wogegen die Terminalknospen in Ruhe verharren, wahrscheinlich ist der Wundreiz in der Nähe der Schnittflächen für dieses Treiben verantwortlich. Es wird im folgenden immer angeführt, ob Terminal- oder Seitenknospen treiben.

1. Salix.

Versuchsbeginn: 29. September, Bad in ½proz. Lösungen. Dauer: 15 Stunden.

8. Oktober. Mangan: Terminalknospen treiben.

15. Oktober. Mangan treibt; an den Schnittflächen unten treiben auch einzelne Wasserkontrollen. Terminalknospen in Ruhe.

2. Quercus pedunculata.

Versuchsbeginn: 28. September. 14stündiges Bad in 0,5proz. Lösungen.

21. Oktober. Mangan: Terminalknospen treiben.

24. Oktober. Mangan: Terminalknospen sehr gut treiben, Wasserkontrollen: an den Schnittflächen einige Knospen treiben.

27. Oktober. Mangan: *alle* Terminal- und Seitenknospen treiben, Wasserkontrollen: nur vereinzelte Seitenknospen.

3. Populus.

Versuchsbeginn: 22. September. 14stündiges Bad in 0,5proz. Lösungen.

27. Oktober. Mangan treibt leicht.

3. Oktober. Ein Teil der Zweige bei Mangan entfaltet, Kontrolle nichts.

Birken, die im September in 0,5proz. Lösungen von $MnSO_4$ 14 Stunden gebadet wurden, konnten bis Dezember, dann wurde der Versuch abgebrochen, nicht zum Austreiben gebracht werden. Wahrscheinlich war der Lichtmangel im Glashaus daran schuld, denn im Lichtraum konnten die Birkenknospen

in kurzer Zeit zur Entfaltung gebracht werden. Die Knospen von der gewöhnlichen Heckenrose, die am 18. November 14 Stunden in 5proz. Lösungen von Manganosulfat gebadet wurden, konnten durch das Manganbad desgleichen nicht stimuliert werden. Wahrscheinlich war die Ruhezeit dieses Strauches schon ausgeklungen. Bemerkenswert ist aber, daß auch bei diesem Versuch im Dunkeln die Entwicklung völlig unterblieb.

Juglans regia konnte desgleichen im Dezember nicht zur Entwicklung gebracht werden. (Manganosulfat, 0,5proz., 24stündiges Bad, Treibhaus.)

Wenn der frühtreibende Effekt der Mangansalze auch recht bescheiden ist, so ist er doch in den meisten Fällen unverkennbar. Für die prinzipielle Entscheidung der Frage, ob die Manganwirkung der der anderen Lichtkatalysatoren an die Seite zu stellen ist, genügt das Versuchsmaterial, um im bejahenden Sinne zu antworten. Es ist anzunehmen, daß man bei Anwendung stärkerer Konzentrationen größere Erfolge erzielt. Mangan wirkt sichtlich schwächer als die früher geprüften metallischen Lichtkatalysatoren, diese Beobachtung deckt sich gut mit den Befunden von *Neuberg*, der Mangan, im Gegensatz zu den Eisenverbindungen, nur als schwachen Lichtkatalysator anspricht.

Interessant ist es auch, daß die stimulierende Manganwirkung nicht nur an ruhenden Knospen, sondern auch nach *Popoff* (l. c.) an Samen zu beobachten ist. Somit ist abermals ein chemisches Agens gefunden, das auf Samen und ruhende Knospen in gleichem Sinne wirkt und dazu beiträgt, zwischen beiden Prozessen eine Brücke zu schlagen.

5. Über die Rolle der Eisenwirkung bei Knopscher Nährlösung.

Über den frühtreibenden Einfluß von Nährsalzen hat uns *Lakon*[1]) berichtet. Nach den hier mitgeteilten Beobachtungen über die Wirkung von Lichtkatalysatoren auf die ruhende Knospe lag es nahe, auch einmal die Rolle des Eisens bei der frühtreibenden Wirkung der Nährsalze zu studieren. Die *Knop*sche Nährlösung setzt sich wie folgt zusammen:

0,25 g Magnesiumsulfat,
1,00 g Kalknitrat,
0,25 g saures phosphorsaures Kali,
0,12 g Chlorkalium,
Spur Eisenchlorid auf 1000 g aufgegossen.

Verfasserin interessierte es vor allem, ob das Eisen für die frühtreibende Wirkung der Nährlösung verantwortlich zu machen ist, und in zweiter Linie dann, ob das Eisen durch Mangan hierbei vertretbar ist.

Die hier mitgeteilten Versuche beinhalten zunächst nur eine Andeutung und sollen noch weiter verfolgt werden.

Als Versuchsobjekt diente wieder Syringa vulgaris. Die Versuchsanordnung wurde folgendermaßen gewählt. Das Versuchsmaterial wurde in sechs Partien eingeteilt. Partie A wurde in Knop ohne Eisenzusatz eingestellt, B in Knop mit Spuren von Eisenchlorid, C in Knop mit Spuren Manganzusatz ohne Eisenzusatz. D, E, F wird analog aber in Dunkeln angeordnet. G und H sind jeweils die Kontrollen in Wasser. Selbstverständlich wurde der Versuch mit destilliertem Wasser und Orginalreagenzien angesetzt, denn bei derartigen Versuchen muß auf die Reinhaltung der

[1]) *G. Lakon*, Zeitschr. f. Bot. 4, 559, 1912.

Materie peinlich geachtet werden. Versuchsbeginn am 20. November. Nach 10 Tagen wird allgemein die Nährlösung in genau derselben Weise erneuert.

14. Dezember. B Terminalknospen treiben, sonst Ruhe.

16. Dezember. A je zwei Seitenknospen treiben. G desgleichen, B vier Terminalknospen an der Entfaltung und zahlreiche Seitenknospen treiben. Wasserkontrollen in Ruhe. Im Dunkeln verharren D und Wasserkontrollen in Ruhe, E vereinzelte Knospen treiben an der Schnittfläche, Mangan desgleichen.

17. Dezember. B die Terminalknospen gehen an die Entfaltung, A mehrere Seitenknospen treiben gut, Terminalknospen in Ruhe, C und G unverändert. Dunkel unverändert.

Ein zweiter derartiger Versuch wurde noch mit der Roßkastanie ausgeführt. Die Versuchsanordnung war wieder dieselbe, wie bei Flieder. Versuchsbeginn am 17. Dezember (ohne Dunkelkontrollen).

4. Januar. Knop mit Eisen: eine Knospe an der Entfaltung, Knop ohne Eisen: eine Knospe treibt, Knop mit Mangan: eine Knospe treibt, Wasserkontrolle in Ruhe.

6. Januar. Knop und Eisen: mehrere Knospen entfaltet. Knop ohne Eisen: treibt, desgleichen Knop mit Mangan. Wasserkontrolle in Ruhe.

11. Januar. Knop mit Eisen: teils Blätter und Blüten. Knop ohne Eisen geht an die Entfaltung, desgleichen Knop mit Mangan. Wasserkontrollen treiben.

Die beiden Versuche sprechen unbedingt für einen stimulierenden Einfluß des Eisenzusatzes bei der *Knop*schen Nährlösung, der durch das nahe verwandte Mangan nicht ersetzt werden kann. Allerdings kommt auch der *Knop*schen Lösung allein Frühtreiberfolg zu.

Diese Versuche beanspruchen ein über das Ruheproblem hinausgehendes Interesse, da sie eine Beziehung zu den Reizversuchen bei Pilzen andeuten. Es will Verfasser überhaupt scheinen, daß man bei näherer Untersuchung sicher Übereinstimmendes zwischen den Stimulantia bei Samenkeimung, Frühtreiben und Pilzentwicklung finden wird.

Im vorliegenden Falle spielt der Lichteinfluß jedenfalls auch eine Rolle, denn am Lichte ist der Einfluß des Eisens viel markanter.

IV. Diskussion der Ergebnisse.

Die Winterknospen unserer Holzgewächse sind durch eine allgemeine Lichtempfindlichkeit ausgezeichnet. Je tiefer die Ruhe, um so prägnanter der Lichteinfluß.

Bei den von mir geprüften Gewächsen bedingte nur kontinuierliche Belichtung Wachstum, ein Vorbelichten vermochte den wachstumshemmenden Einfluß der Dunkelheit nicht zu beseitigen. Selbst dem schwachen Glashauslicht kommt eine Bedeutung zu. Völliger Entzug desselben wirkt auch hemmend auf die Entwicklung der Knospen.

Es ist leider heute noch wenig bekannt über einen genauen Vergleich der Wirkungsweise der einzelnen Treibverfahren im Lichte und Dunkeln. Eine solche genaue Untersuchung wäre recht interessant. Um den

Einfluß des Lichtes hat man sich bei den verschiedenen Treibverfahren herzlich wenig gekümmert. Spielt das Licht bei den *anderen* Treibverfahren tatsächlich eine Rolle, beispielsweise, daß durch Lichtentzug der Erfolg wesentlich verringert wird, dann kommt entschieden dem Licht eine allgemeine Bedeutung zu. Die Versuche, die bereits an warm gebadeten Knospen angestellt wurden, sprechen für einen, wenn auch bescheidenen Einfluß des Lichtes. Es ist aber auch gut denkbar und meiner Ansicht nach sehr wahrscheinlich, daß der Einfluß des Lichtes, ähnlich wie bei den Lichtsamen, ersetzbar ist. Es läßt sich dabei sogar eine verblüffende Übereinstimmung mit den Samen konstruieren. Nicht alle Samen werden in gleichem Grade durch chemische Agenzien im Dunkeln stimuliert, ebenso sind nicht alle Winterknospen durch chemische Agenzien gleich leicht treibbar. Das *Licht* übt nun gerade auf die sonst schwer treibbaren Gewächse den günstigsten Einfluß aus, diese Tatsache ist einigermaßen auffallend und würde wieder dafür sprechen, daß das Licht in der Natur das Primäre ist und nur bei den Versuchen in vitro insofern ersetzbar ist, als durch die chemischen und physikalischen Agenzien gleiche Umsetzungen im Inneren der Knospe bedingt werden, wie durch das Licht. Die Ursache der Ruhe und dann auch des Austritts aus derselben ist sicher in *inneren* Vorgängen zu suchen. Man kann sich beispielsweise vorstellen, daß in der Natur eben erst durch den Einfluß des Lichtes die trägen Stoffwechselvorgänge wieder in Gang gesetzt werden, was in vitro auch durch andere Reize zu erzielen ist. Es ist sehr leicht möglich, daß das Licht überhaupt nur beim *Austreiben* als Anstoß zur Einleitung der normalen Prozesse wirkt.

Meiner Ansicht nach muß man die Vorgänge in Natur und Laboratorium trennen. Die vielen Treibstimulantia bedingen alle irgendwelche Reize, die denselben Vorgang auslösen können, wie in der Natur die zunehmende Beleuchtung. Daß verschiedene Reizstoffe gleiches bedingen, kann man auch an Versuchen mit Mikroorganismen sehen, und man scheut hier auch nicht zurück, alle diese Stoffe gleich zu werten und ihnen eine gemeinsame Wirkungsweise zuzuschreiben.

Durch systematische Verdunkelung von Winterknospen und Beobachtung derselben könnte man Aufschluß erhalten. Die Knospen müßten aber schon zeitig im Winter verdunkelt werden, da gewisse Gewächse schon im Januar, also gerade zu der Zeit, wo die Tage länger werden, wieder treibfähig sind. Treiben, sagen wir Fliederknospen, die wir im Oktober verdunkelt im Gewächshaus aufstellen, bei Ausklingen der Ruhe im Januar, Februar willig aus, dann ist natürlich der primäre Lichteinfluß eindeutig widerlegt. Dann wirkt das Licht eben nur als ein Reiz so gut wie jeder andere und jede Bedeutung „„sui generis" ist ihm für das Treibproblem genommen.

Die Wirkung des Lichtes auf die Winterknospen ist durch geeignete Lichtkatalysatoren verstärkbar. Auch die beiden in der Natur vorkommenden Lichtkatalysatoren, Äsculin und Chlorophyll, wirken in diesem Sinne. Besonders wertvoll erscheint diese Feststellung für das Chlorophyll. Erstens einmal gibt sie einen neuerlichen Beweis für die übereinstimmende Wirkung von Chlorophyll und den bekannten Lichtkatalysatoren in vitro. Fernerhin stützt sie unsere Ansicht von der *natürlichen spezifischen* Lichtempfindlichkeit der ruhenden Knospen. Die Tätigkeit des Chlorophylls, die so innig an die Anwesenheit von Licht gebunden ist, spielt sicher bei dem Austritt aus der Ruhe keine zu unterschätzende Rolle.

Die Manganwirkung entspricht annähernd der der früher besprochenen metallischen Lichtkatalysatoren. Mangan ist aber fernerhin noch durch seine vielseitige Wirksamkeit bekannt, es ist als Stimulans auf den verschiedensten Gebieten, wie bei der Samenkeimung, der Entwicklung verschiedener Mikroorganismen und nicht zuletzt, wie hier erwähnt, beim Frühtreiben verwendbar. Auf diese Probleme wird später einmal an geeigneter Stelle eingegangen.

Von allgemeinem Interresse ist auch die Bedeutung des Eisens bei der frühtreibenden Wirkung *Knop*scher Nährlösung. Der Unterschied, der sich hier ergibt, ist gering, groß genug aber, um von theoretischer Bedeutung zu sein. Auch hier tritt der Erfolg bei Licht markanter auf, und die in Frage kommenden Mengen sind so gering, daß man die Wirkung des Eisens auch hier als *lichtkatalytisch* betrachten muß.

Das Problem des Lichttreibens ist natürlich mit diesen Ausführungen noch nicht geklärt. Immerhin ist den mitgeteilten Untersuchungen *eindeutig* zu entnehmen, daß dem Lichte beim Erwecken ruhender Knospen eine große Bedeutung zukommt. Ob die Lichtwirkung des primär bei dem Zustandekommen und vor allem Ausklingen der Ruhe ein mitbestimmender Faktor ist, werden künftige Versuche zeigen. Wie diese Versuche auch ausfallen mögen, eines bleibt sicher bestehen, daß das Licht ein gutes und praktisches Frühtreibmittel ist und praktisch wohl befähigt wäre, anderen Verfahren Konkurrenz zu machen, gleichgültig, ob es sich nun bei der Lichtwirkung um etwas Primäres oder Sekundäres handelt.

Quantitative Bestimmung der Gelatine.

Von

Emil Lenk.

(Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der A.-G. für Min.-Ind. vorm. D. Fanto & Comp., Wien, Chemische Werke Stockerau.)

(Eingegangen am 19. August 1926.)

Mit 11 Abbildungen im Text.

Die zahlreichen Arbeiten über den Eiweißstoff Gelatine sind in allen einschlägigen „Lehrbüchern"[1]) zu finden; es erübrigt sich deshalb, auf Details einzugehen. Eine brauchbare quantitative Bestimmung der Gelatine scheint aber noch nicht beschrieben zu sein. Eine solche Methode hat nicht nur rein theoretisches Interesse, sie ist auch für die Beurteilung von Handelswaren nötig; es wird gezeigt werden, daß sie bessere Resultate liefert als die bisherige Bestimmungsmethode mit Hilfe der Viskosität. Zur Wertbeurteilung eines Leimes oder einer Handelsgelatine ist außer Farbe, Geruch und ähnlichen Eigenschaften der gelatinierende Anteil von Wichtigkeit. *Die handelsübliche Wertbestimmung dieser Produkte mit Hilfe der Viskosität zeigt zahlreiche Fehlerquellen* und führte auch bei Schiedsgerichtsanalysen zu mannigfachen Unstimmigkeiten.

Das charakteristische Merkmal eines Leimes (Leder- oder Knochenleimes) *oder einer Handelsgelatine* (Gold-, Silber-, Kupferblatt) *ist die Gelatinierungsfähigkeit* bestimmt konzentrierter Lösungen bei entsprechend niedriger Temperatur. Bei gleicher Konzentration und gleicher Temperatur erstarren Lösungen von Handelsgelatine früher als von Leim. Die Handelsgelatine enthält daher mehr „gelatinierende Substanz" als der Leim, bei dem die gelatinierende Substanz im Gang der Fabrikation entweder absichtlich oder unabsichtlich durch verschiedene Schädigungen (Lauge, Säure, zu hohe Temperatur, bakterielle Infektion) zum Teil zu nicht mehr gelatinierenden Bestandteilen abgebaut wurde. Parallel damit ist auch beim Leim die Aminosäurefraktion größer als bei der Handelsgelatine.

[1]) Z. B. *Rudolf Höber*, Physik. Chem. d. Zelle u. d. Gewebe, 5. Aufl., 1924; *Wo. Ostwald*, Kolloidchemie; *Wo. Pauli*, Kolloidchemie d. Eiweißkörper I. usw.

Nach vielen Vorversuchen, die hier nicht wiedergegeben sind, ergab sich eine praktische Methodik, die im Laufe der Untersuchungen beibehalten wurde.

1. Auflösung des Untersuchungsmaterials.

Das Material muß sehr vorsichtig in Lösung gebracht werden. Die Blattgelatine wird in etwa 2 qcm große Stücke zerschnitten, ein Teil einer Leimtafel klein geschlagen und in entsprechend viel destilliertem Wasser von Zimmertemperatur in einem Becherglas eingeweicht. Leim muß stundenlang quellen, Blattgelatine nur etwa eine Viertelstunde. Beim Leim setzt man zur Verhütung eines bakteriellen Abbaues etwas Toluol zu. Ist das Material gut durchgeweicht, so stellt man das Becherglas in ein Wasserbad von 40 bis 45° und rührt so lange mit einem Glasstab, bis in etwa 10 bis 15 Minuten vollständige Lösung eintritt. Die Konzentration der Lösungen ist dem Gelatinegehalt der Produkte anzupassen. Bei der Handelsgelatine stellt man 1- oder 2-, beim Leim 5- oder 10proz. Lösungen her. Da die Handelsprodukte wechselnde Wassermengen enthalten, bestimmt man zuerst ihren Wassergehalt und stellt die Konzentration der Lösungen auf wasserfreie Ware ein.

2. Wahl des Gelatinierungsgefäßes.

Am besten bewährten sich gewöhnliche Reagenzgläser von genau gleicher innerer Weite. Unter sonst genau gleichen Bedingungen gelatiniert eine Lösung in weiteren Reagenzgläsern langsamer, als in schmäleren. Unterschiede von ½ mm sind ohne Belang. Wir verwenden stets etwa 13 cm lange Gläser von 1,3 mm lichter Weite, die mit 10 ccm Flüssigkeit gefüllt werden.

3. Wahl der Gelatinierungstemperatur.

Die Gelatinierung wird bei einer konstanten Temperatur von 15° vorgenommen. Die Temperatur der in Lösung gebrachten Substanz beträgt, wie oben bemerkt, 40 bis 45°. Es ist nicht günstig, das Reagenzglas mit der etwa 40°-Lösung sofort in das Wasserbad von 15° einzutauchen. Es stellte sich vielmehr im Laufe der Untersuchung heraus, daß es besser sei, die Lösung im Reagenzglas auf eine Temperatur von 20 bis 22° etwa 1 Minute vorzukühlen und dann erst ins Wasserbad von genau 15° einzutauchen. Auf diese Weise erhält man leicht reproduzierbare Resultate.

4. Endpunkt der Gelatinierung.

Die Gelatinierungszeit beobachtet man mit einer Stoppuhr oder einer gewöhnlichen Uhr mit einem Sekundenzeiger. Mit der Zeitmessung beginnt man erst beim Eintauchen des Reagenzglases in das Wasserbad von 15°. Von Zeit zu Zeit hebt man das Reagenzglas auf etwa 1 Sekunde aus dem Wasserbad und beobachtet die Veränderungen an der Oberfläche der Flüssigkeit. Die Lösung beginnt langsam zähflüssiger zu werden und erstarrt allmählich. Die Gelatinierung ist zu Ende, wenn die Lösung aus dem umgekehrten Reagenzglas nicht mehr fließt. Man erfaßt das Glas oben mit Daumen und Zeigefinger der rechten Hand, dreht es um und läßt es durch seine eigene Schwere mit der Kuppe auf den ausgestreckten Zeigefinger der linken Hand in einer Entfernung von etwa 3 cm auffallen. Fließt die

Lösung nicht mehr und steigen keine Luftblasen mehr auf, so ist das Ende der Gelatinebestimmung eingetreten. Bei geringer Übung ist dieser Punkt auf einige Sekunden genau zu treffen. Es ist nur zu beachten, daß das Reagenzglas bei der Feststellung des Endpunktes jedesmal nur 1 bis 2 Sekunden aus dem Wasserbad von 15° herausgenommen werden darf. Stets werden Doppelbestimmungen ausgeführt.

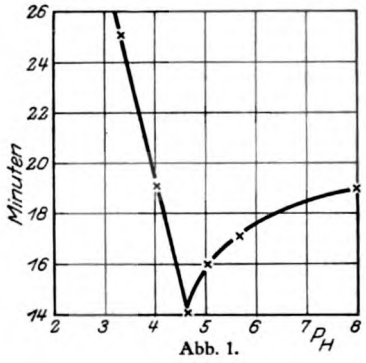


Abb. 1.

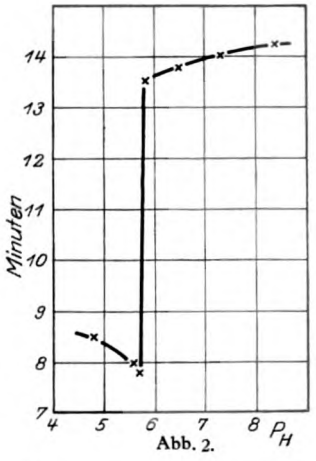


Abb. 2.

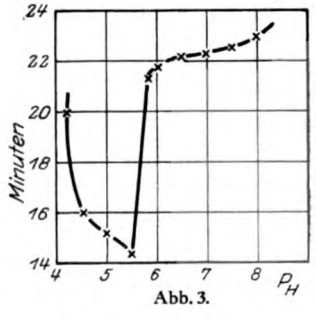


Abb. 3.

5. Zusammenhang zwischen Gelatinierungszeit und dem p_H der Lösung.

In *Michaelis* „Praktikum"[1] ist ein Beispiel beschrieben, bei dem der Zusammenhang zwischen p_H und Gelatinierungszeit der nachfolgenden Kurve entsprechend, wiedergegeben ist. (Abb. 1).

Die Kurve hat zwei Äste; der Umkehrpunkt liegt bei $p_H = 4{,}6$. Diesen charakteristischen Kurvengang konnten wir immer wieder finden, doch lag der Umkehrpunkt nicht oft bei $p_H = 4{,}6$. Aus einer größeren Versuchsanzahl seien der Kürze wegen nur zwei mitgeteilt.

Tabelle I.

a) Tafelleim A, 3proz. Lösung.

p_H	Gelatinierungszeit	p_H	Gelatinierungszeit
4,7	8′ 30″	6,5	13′ 45″
5,6	8 00	7,3	14 05
5,7	7 45	8,4	14 15
5,8	13 35		

Tabelle II.

b) Tafelleim B, 5proz. Lösung.

p_H	Gelatinierungszeit	p_H	Gelatinierungszeit
4,2	20′ 02″	6,0	21′ 40″
4,5	16 04	6,5	22 10
5,0	15 15	7,0	22 18
5,5	14 20	7,5	22 30
5,8	21 15	8,0	23 00

Bei diesen beiden Leimsorten beobachtet man zwischen $p_H = 5{,}5$ bis 5,8 einen scharfen Knick in der Kurve, der, wie Abb. 2 zeigt, scharf zwischen

[1]) *L. Michaelis*, Praktikum der physik. Chemie, 2. Aufl., 1922, S. 108.

p_H = 5,7 und 5,8 liegt. In allen von uns beobachteten Fällen sahen wir eine deutliche Abflachung der Kurve von etwa p_H = 6,0 weiter ins alkalische Gebiet, um nur sehr langsam anzusteigen.

Der Kurvensprung tritt bei dem Versuch von *Michaelis* mit „Gelatine" bei p_H = 4,6, bei unseren Versuchen mit Tafelleim aber zwischen p_H = 5,5 bis 5,8 ein. Es fragt sich nun, worauf diese Unterschiede im Optimum zurückzuführen sind. Der Umkehrpunkt bedeutet offenbar den isoelektrischen Punkt des verwendeten Materials. Mit Hilfe der Überführungsmethode[1]) wurde, als Mittelwert, der isoelektrische Punkt der Gelatine mit p_H = 4,60 angenommen, welcher mit dem von *Chiari*[2]) mittels des Quellungsmaximums gefundenen (p_H = 4,7) übereinstimmt. Der Unterschied im p_H des isoelektrischen Punktes beruht auf einem erheblichen Gehalt unseres Materials an Elektrolyten. *Chiari* arbeitete mit aschefreier Gelatine und *Michaelis* gibt an „die käufliche Gelatine enthält so wenig Elektrolyte, daß auf unsere Methode, wo wir ja doch stets ein Elektrolytgemisch als Regulator hinzufügen, die Entfernung der letzten Spuren . . . ganz überflüssig war". Ferner fanden *Patten* und *Kellems*[3]) den isoelektrischen Punkt der aschearmen Gelatine, die nur 0,011 Proz. Asche enthielt, bei p_H = 4,8, während käufliche Gelatine den isoelektrischen Punkt (nach ihren Untersuchungen) bei p_H = 5,6 hatte.

Zur Klärung dieser Differenzen untersuchten wir zwei Leimplatten derselben Fabrik, von denen die eine normal hergestellt war, während die andere in der betreffenden Fabrik durch ein Osmoseverfahren ascheärmer wurde. Aschen- und Trockengehalt betrug:

Tabelle III.

	Trockensubstanz Proz.	Asche Proz.
Normaler Leim . .	84,6	0,73
Osmose-Leim . . .	85,6	0,16

Der „normale Leim" enthielt also rund fünfmal mehr anorganisches Material als der „Osmose-Leim". Von beiden Leimsorten stellten wir auf dieselbe Weise wie oben in bezug auf Trockensubstanz 2proz. Lösungen her und bestimmten die Gelatinierungszeit der auf verschiedenes p_H gebrachten Lösungen.

Tabelle IV.

Normaler Leim		Osmose-Leim	
p_H	Gelatinierungszeit	p_H	Gelatinierungszeit
5,7	11′ 00″	4,9	8′ 00″
5,9	5 00	5,5	4 30
6,3	8 00	5,9	14 45
6,5	10 45	6,0	21 30
6,7	12 30	7,0	31 00
7,0	15 30	7,5	31 30
7,3	15 30		
7,5	15 30		

[1]) *L. Michaelis* und *Davidsohn*, diese Zeitschr. **33**, 456, 1911; **41**, 373, 1912.
[2]) *Chiari*, ebendaselbst **33**, 167, 1911.
[3]) *Patten* und *Kellems*, Centralbl. **1920**, III, 717.

Der Umkehrpunkt der Kurve tritt beim aschearmen Leim bei $p_H = 5{,}5$, beim aschereicheren Leim bei $p_H = 5{,}9$ ein. Auch bei diesen Versuchen geht die Kurve im Gebiet $p_H = 7{,}0$ bis 7,5 mit der Abszissenachse ziemlich parallel.

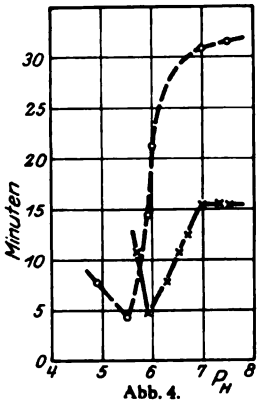


Abb. 4.

—— Normaler Leim.
----- Osmose-Leim.

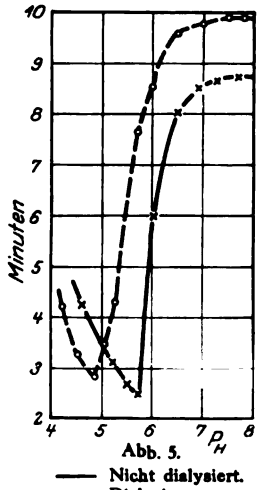


Abb. 5.

—— Nicht dialysiert.
----- Dialysiert.

Als weiteren Versuch benutzten wir eine Handelsgelatine, von der ein Teil in 3proz. Lösung (nach Toluolzusatz) bei 30° 3 Stunden im rotierenden Dialysator dialysiert wurde. Die Lösung der dialysierten und nicht dialysierten Gelatine stellten wir auf die Konzentration von 1,3 Proz. (bezogen auf die Trockensubstanz) ein und bestimmten wieder den Zusammenhang zwischen p_H und Gelatinierungszeit.

Tabelle V.

Nicht dialysiert		Dialysiert	
p_H	Gelatinierungszeit	p_H	Gelatinierungszeit
4,6	4′ 15″	4,2	4′ 15″
5,2	3 10	4,5	3 15
5,5	2 40	4,7	2 50
5,7	2 30	5,0	3 30
6,0	6 00	5,3	4 15
6,5	8 02	5,7	7 40
6,9	8 34	6,0	8 30
7,2	8 40	6,5	9 25
7,7	8 42	7,0	9 45
		7,5	9 50
		7,8	9 50

Umkehrpunkt der Kurve bei der nicht dialysierten Gelatine (mit 0,82 Proz. Asche) bei $p_H = 5{,}7$ und bei der dialysierten Gelatine (mit 0,03 Proz. Asche) bei $p_H = 4{,}7$. Die dialysierte Gelatine ist durch das dreistündige Stehen bei 30° etwas geschädigt worden, daher das etwas verspätete Gelatinieren bei $p_H = 7{,}0$ bis 7,8, gegenüber der nicht dialysierten Gelatine.

Aus allen diesbezüglichen Versuchen geht also hervor, daß der *Optimalpunkt der Kurve zwischen $p_H = 4{,}6$ bis 5,9* derart schwanken kann, daß der *isoelektrische Punkt einer aschearmen Gelatine im mehr sauren Gebiet liegt, als der von gewöhnlichem, aschereicheren Produkt.* Diese Kurven entsprechen den *Dissoziationskurven* eines Eiweißstoffes[1]).

Bei einer Gelatinebestimmungsmethode ist deshalb größter Wert auf ein konstantes p_H der zu untersuchenden Lösungen zu legen. Aus allen unseren Versuchen, von denen der Kürze wegen nur einige wiedergegeben sind, ist zu schließen, daß der *Kurvenverlauf zwischen $p_H = 7{,}0$ bis 7,5 praktisch parallel zur Abszissenachse* verläuft, d. h. *innerhalb dieses p_H-Gebietes (7,0*

[1]) Z. B. *Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., 1924, S. 102ff.; *Höber*, l. c., S. 256ff.

bis 7,5) tritt die Gelatinierung einer Lösung praktisch immer zu gleicher Zeit ein. Es ist daher innerhalb dieses p_H-Gebietes nicht nötig, das p_H der Lösung genau festzulegen, es genügt vollkommen, die Lösung mit einigen Tropfen einer verdünnten Säure oder Lauge vorsichtig zu neutralisieren und sich durch Tüpfeln auf ein empfindliches Lackmuspapier von der Neutralität der Lösung zu überzeugen. Vorher stellt man fest, bei welchem p_H das Lackmuspapier umschlägt, was normal bei $p_H = 7{,}0$ erfolgt. Es ist dann besser, die Lösung so weit zu neutralisieren, bis sich rotes Lackmuspapier ganz schwach bläut. Die Farbennuance ist leicht zu treffen und kann eventuell durch eine p_H-Bestimmung kontrolliert werden.

6. Zusammenhang zwischen Konzentration und Gelatinierungszeit.

A. Versuche mit Handelsgelatine.

a) Goldblattgelatine.

Trockensubstanz 84,4 Proz. Es wurde eine in bezug auf die Trockensubstanz 2proz. Lösung von $p_H = 7{,}2$ hergestellt.

b) Goldblattgelatine einer anderen Marke.

Trockensubstanz 84,1 Proz. Herstellung einer in bezug auf die Trockensubstanz 2proz. Lösung vom $p_H = 7{,}4$.

Tabelle VI.

Gelatine a		Gelatine b	
Konzentration Proz.	Gelatinierungszeit	Konzentration Proz.	Gelatinierungszeit
2	4′ 30″	2	2′ 30″
1,8	8 00	1,8	4 00
1,6	13 02	1,6	7 30
1,4	25 50	1,4	15 00
1,2	45 00	1,2	29 02
1,0	86 20	1,0	58 00
0,8	200 00	0,8	120 00
0,6	320 00	0,6	210 00

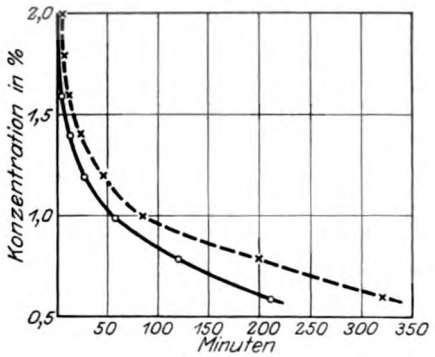


Abb. 6.

c) Goldblattgelatine D. G. F.

Trockensubstanz 85,2 Proz. Herstellung einer in bezug auf die Trockensubstanz 1,35proz. Lösung. $p_H = 7{,}2$.

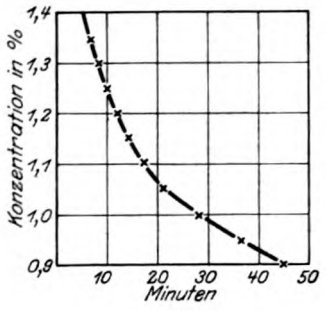


Abb. 7.

Tabelle VII.

Konzentration Proz.	Gelatinierungszeit	Konzentration Proz.	Gelatinierungszeit
1,35	6′ 30″	1,10	17′ 00″
1,30	8 02	1,05	21 00
1,25	10 08	1,00	28 00
1,20	12 05	0,95	36 36
1,15	14 06	0,90	45 05

Diese Goldblattgelatine D. G. F. hat sich bei unseren Untersuchungen, die mit etwa 60 verschiedenen Gelatinesorten ausgeführt wurden, als die beste käufliche „Gelatine" erwiesen. Deshalb ist diese Gelatinesorte für uns als *Standardgelatine* anzusehen. Es sei aber bemerkt, daß nicht alle am Markt vorhandenen „D. G. F.-Goldblattgelatine"-Sorten gleich sind; es sind vielmehr gleich bezeichnete Sorten im Handel, die einen geringeren Gelatinegehalt besitzen, als die von uns oben angegebene D. G. F.-Standard-Gelatine. Der Fabrikationsgang ist sicher nicht ganz gleichmäßig zu führen, so daß leicht Läsionen eintreten können. Jedenfalls sei vorgeschlagen, die genannte und von uns oben angegebene D. G. F.-Goldblattgelatine als Standardgelatine anzusehen.

B. Versuche mit Leim.

Die Prozentzahlen bedeuten die Konzentration, bezogen auf wasserfreie Ware. Von etwa 100 untersuchten Leimsorten seien nur drei angegeben.

Tabelle VIII.

Leim 1		Leim 2		Leim 3	
Proz.	Gelatinierungszeit	Proz.	Gelatinierungszeit	Proz.	Gelatinierungszeit
10	2′ 00″	10	6′ 40″	5	24′ 00″
9	3 08	9	13 00	4,5	38 05
8	5 10	8	20 00	4	70 10
7	10 00	7	35 05		
6	18 20	6	60 00		
5	40 05				
4	86 20				

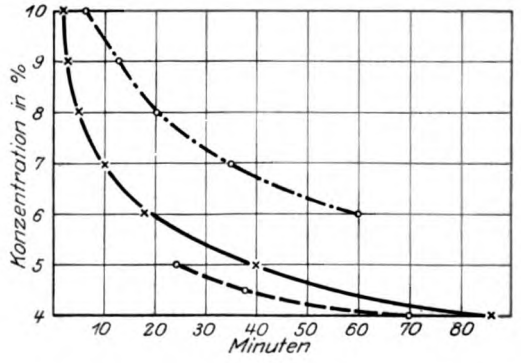


Abb. 8.

Trägt man auf die Abszisse den Logarithmus der Gelatinierungszeiten (in Minuten) und auf die Ordinate die Zahlen der Konzentration in Prozenten auf, so erhält man eine Gerade. Die für verschiedene Produkte konstruierten Geraden gehen einander parallel.

Als Beispiel gelte unsere Standardgelatine (S. 440, Tabelle VII. Abb. 7).

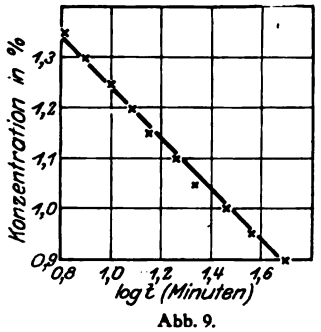


Abb. 9.

Als weiteres Beispiel seien die beiden Handelsgelatinesorten (Gelatine a u. b) gewählt (S. 439, Tabelle VI, Abb. 6).

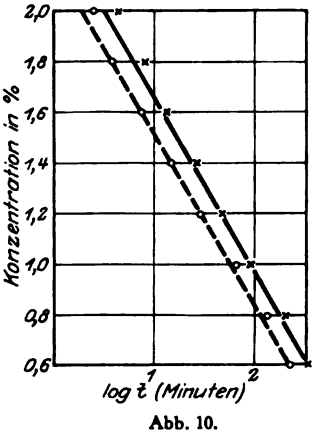


Abb. 10.

7. Berechnung der Konstanten der gefundenen Geraden.

Die Gleichung einer Geraden lautet: $y = ax + b$; die Konstanten werden aus den Gleichungen berechnet:

$$y_1 = ax_1 + b, \qquad y_2 = ax_2 + b,$$

$$a = \frac{y_1 - y_2}{x_1 - x_2}, \qquad b = \frac{x_1 y_2 - x_2 y_1}{x_1 - x_2}.$$

x = Logarithmus aus der Minutenzahl,
y = Konzentration in Prozenten.

Als Standard wählten wir die D. G. F.-Gelatine (s. S. 440 und 441, Tabelle VII, Abb. 7 und 9).

Tabelle IX.

$x = \log t$	y = Konzentration in Proz.
0,903 ... x_2	1,30 ... y_2
1,447 ... x_1	1,00 ... y_1

$a = -0{,}55, \qquad b = 1{,}8.$

Die Gelatinekonzentration berechnet man daher nach der Formel: $y = -0{,}55\,x + 1{,}8$, wobei y die Konzentration in Prozenten, x den Logarithmus aus der Minutenzahl (Gelatinierungszeit) bedeutet.

Zur Feststellung, ob die Formel für alle Verdünnungen stimmt, sei in der Tabelle X die Konzentration (in Prozenten) berechnet und der tatsächlichen Konzentration (in Prozenten) gegenübergestellt. Beispiel: D. G. F.-Goldblattgelatine (S. 440 und 441, Tabelle VII, Abb. 7 und 9).

Tabelle X.

Gelatinierungszeit	Proz.	Berechnet Proz.	Gelatinierungszeit	Proz.	Berechnet Proz.
6′ 30″	1,35	1,35	17′ 00″	1,10	1,12
8 02	1,30	1,31	21 00	1,05	1,07
10 08	1,25	1,25	28 00	1,00	1,00
12 05	1,20	1,21	36 36	0,95	0,94
14 06	1,15	1,15	45 05	0,90	0,89

Die mit Hilfe der Formel $y = -0{,}55\,x + 1{,}8$ berechneten Gelatinekonzentrationen stimmen mit den tatsächlichen Konzentrationen überein.

8. Berechnung der Gelatinekonzentration mit Hilfe der Formel.

Im folgenden seien die Konzentrationen der hier erwähnten Gelatine- bzw. Leimsorten aus der Formel berechnet und aus den Verdünnungen (in Prozenten) umgerechnet.

Tabelle XI.

a Goldblattgelatine			b Goldblattgelatine		
Gelatinierungszeit	Lösung Proz.	Gelatine berechnet Proz.	Gelatinierungszeit	Lösung Proz.	Gelatine berechnet Proz.
4′ 30″	2,0	72,00	2′ 30″	2,0	79,00
8 00	1,8	72,50	4 00	1,8	81,67
13 02	1,6	74,38	7 30	1,6	82,50
25 50	1,4	72,86	15 00	1,4	82,14
45 00	1,2	74,17	29 02	1,2	83,33
86 20	1,0	74,00	58 00	1,0	83,20
200 00	0,8	66,25	120 00	0,8	82,50
320 00	0,6	70,00	230 00	0,6	87,33

Aus den Versuchen kann man schließen: Die berechneten Konzentrationen stimmen bei der a) Goldblattgelatine innerhalb der Gelatinierungszeiten 13 bis 86 Minuten und bei der b) Goldblattgelatine zwischen der 7½ bis 120. Minute gut überein.

Tabelle XII.

Leim 1			Leim 2			Leim 3		
Gelatinierungszeit	Lösung Proz.	Gelatine berechnet Proz.	Gelatinierungszeit	Lösung Proz.	Gelatine berechnet Proz.	Gelatinierungszeit	Lösung Proz.	Gelatine berechnet Proz.
2′ 00″	10	15,40	6′ 40″	10	13,40	24′ 00″	5	20,82
3 08	9	16,94	13 00	9	13,22	38 05	4,5	20,69
5 10	8	17,63	20 00	8	13,56	70 10	4	19,75
10 00	7	17,86	35 05	7	13,57			
18 20	6	18,33	60 00	6	13,67			
40 05	5	18,40	102 00	5	13,92			
86 20	4	18,50						

Die berechneten Gelatinezahlen stimmen bei diesen Leimversuchen gut zwischen der 5. bis 102. Minute überein.

Die Formel $y = -0{,}55\,x + 1{,}8$ bewährte sich, wie diese und zahlreiche andere Versuche dieser Art bewiesen für die Gelatinierungszeit zwischen der 5. bis 120. Minute. Es wird aber empfohlen, diese Zahlen noch etwas einzuschränken; *es ist am besten, die Gelatinierungszeit zwischen der 10. bis 60. Minute zu wählen, da die Beobachtungen innerhalb dieser Zeit am genauesten sind.*

9. Zusammenhang zwischen Gelatinegehalt und Viskosität.

Wie oben erwähnt, gewöhnte man sich bisher, zur Wertbestimmung eines Leimes oder einer Handelsgelatine die Viskositätsbestimmung mit Hilfe des *Engler*schen Apparats anzuwenden[1]). Auf die großen Fehlerquellen dieser Methode wies man schon seit Jahrzehnten hin; man verwendete aber die Viskositätsbestimmung aus Mangel einer anderen Methode weiter. Man ließ den Leim 1 bis 2 Tage quellen, schmolz die Masse, brachte die „Lösung" auf 15 Proz., erwärmte sie ½ Stunde hindurch auf die Temperatur des siedenden Wassers und ermittelte die Viskosität im Englerapparat bei 35°. Das Erhitzen im kochenden Wasserbad soll notwendig sein, um „vergleichbare Werte zu erzielen". „Nimmt man es nicht vor", sagt *Steinherz*[2]), „so wird der Viskositätswert desselben Leimes verschieden ausfallen, je nachdem die Leimlösung kürzer oder länger einer niedrigen oder höheren Temperatur beim Schmelzen ausgesetzt wurde. Nach halbstündigem Erhitzen dagegen soll die Viskosität konstant sein. Diese Anschauung ist unrichtig, wie auch *Steinherz* nachwies, da eine Konstanz der Viskosität durch das Erhitzen nicht zu erhalten ist. Das halbstündige Erwärmen im kochenden Wasserbad muß ja schon aus dem Grunde unrichtig sein, weil die „gelatinierende Substanz" bei hoher Temperatur besonders leicht im sauren oder alkalischen Gebiet abgebaut wird. Je weiter das p_H der Lösung vom isoelektrischen Punkt der Gelatine entfernt ist, um so leichter gelingt der Abbau.

Der Viskositätsbestimmung haften viele Fehler an, die besonders bei guten Leimen augenfällig sind. Der bei 35° untersuchte 15proz. Leim fließt nicht in einem zusammenhängenden Strahle aus der Öffnung des Viskosimeters aus, sondern tropft nur oder fließt zuerst und beginnt während der Bestimmung zu tropfen. Ein „Tropfen" gehorcht aber anderen physikalischen Gesetzen, als der Strahl. Außer diesen technischen Mängeln seien weitere Bedenken gegen die Viskositätsmethode geäußert. Sie wurde ohne Rücksicht auf die Reaktion der Lösung ausgeführt; zahlreiche Arbeiten jedoch bewiesen die Abhängigkeit der Viskosität vom p_H der Gelatinelösungen[3]). Ferner ist die Viskosität von Salzzusätzen abhängig, und zwar erhöhen Sulfate, während Chloride die Zähigkeit erniedrigen[4]).

---

[1]) Ullmanns Enzykl. d. techn. Chem. **6**, 53, 1919.

[2]) *Steinherz*, Chem.-Ztg. 1912, S. 1505.

[3]) *Schröder*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **45**, 75, 1903; *Wo. Ostwald*, Kolloidchem. **2**, 209; *Michaelis*, Prakt. d. physik. Chem., 2. Aufl. 1922, S. 105; s. auch *Laqueur* und *Sackur*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **1**, 3, 193, 1903; *Hardy*, Journ. of physiol. Chem. **33**, 251, 1905; *Wo. Pauli*, Kolloidchem. d. Eiweißkörper, Steinkopf, Dresden; *Davis*, *Oates* und *Browne*, Journ. of Chem. Sc. 1921, S. 1536.

[4]) *Wo. Ostwald*, Kolloidchemie 1911, S. 206.

Ferner ist die Viskosität von den „Alterserscheinungen" der Gelatine sehr abhängig. Läßt man Eiweißlösungen stehen, so bleibt die Viskosität nicht gleich, sondern steigt schon nach Minuten an, ohne konstant zu werden. Das Altern der Gelatinelösungen ist abhängig von Temperatur, Konzentration, Salzzusätzen, Reaktion usw. Besonders *Davis* und Mitarbeiter[1]) haben gezeigt, wie sich die Viskosität verschieden konzentrierter Gelatinelösungen bei verschiedener Reaktion mit der Zeit ändert und wie sich die Zähigkeit gleich konzentrierter Gelatinelösungen bei verschiedener Reaktion mit der Zeit verschiebt. Diese Angaben konnten wir vollauf bestätigen.

Weiter ist zu bedenken, daß Leimlösungen keine ganz homogenen Lösungen darstellen, sondern Luftblasen, ungelöste Partikel und dergleichen enthalten. Gelangen sie in die Ausflußöffnung des Viskosimeters, so verzögern sie den gleichmäßigen Abfluß und bringen erhebliche Fehler in die Bestimmung hinein. Man kann sich daher mit der Auffassung *Kisslings*[2]) einverstanden erklären, derzufolge die Viskositätsbestimmung nur dann brauchbare Zahlen liefert, wenn man den Gang ein und derselben Fabrikation verfolgen will oder wenn man stets gleiches Ausgangsmaterial verwendet. Doch muß hinzugefügt werden, daß man die Bestimmung auch dann unter genau definierten Bedingungen ausführen müßte.

Zur allgemeinen Wertbestimmung eines Leimes ist daher die Viskositätsbestimmung ungeeignet. Der *tatsächliche Wert* einer Handelsgelatine oder eines Leimes ist *vom „Gelatine"gehalt abhängig.* Auch die Klebkraft ist um so besser, je mehr „gelatinierende Substanz" ein Leim enthält. Der Tischlerleim darf aber nicht zu viel „Gelatine" enthalten, damit er nicht zu schnell gelatiniere. Der Gelatiniergehalt eines guten Tischlerleims soll nicht zu hoch und nicht zu niedrig sein, er muß etwa 20 bis 40 Proz. Gelatine (bezogen auf die Trockensubstanz) enthalten.

Nicht nur *Kissling*[3]), sondern auch *Halla*[3]), *Arisz*[4]) u. a. haben sich gegen die Beurteilung eines Leimes auf Grund der Viskosität ausgesprochen und rieten, den Leim eher nach seinem Gelatinegehalt zu bewerten.

Die bisherigen Bestimmungsmethoden des Gelatinegehalts waren unbrauchbar. Nach der beschriebenen Methode ist aber der Gelatinegehalt leicht und mit großer Genauigkeit auszuführen und gibt unter Einhaltung der angegebenen Bedingungen konstante und stets reproduzierbare Werte. Die Faktoren, welche die Viskosität beeinflussen, kommen für die Bestimmung der Gelatine nach unserer Methode nicht in Betracht.

Da die Viskosität eines Leimes von verschiedenen, schwer zu übersehenden Faktoren abhängig ist, die beschriebene Gelatinebestimmung aber eine deutlich zu übersehende Charakteristik einer Handelsgelatine oder eines Leimes darstellt, so *wird empfohlen, die Viskositätsbestimmung fallen zu lassen und die Bestimmung des Gelatinegehaltes als Maßstab einer Handelsgelatine oder eines Leimes einzuführen.*

Die Viskosität steht mit dem Gelatinegehalt in einem gewissen Zusammenhang, wie dies aus der folgenden Tabelle XIII und Abb. 11 zu ersehen ist. Von 28 Leimsorten wurden gleichzeitig Viskosität und Gelatinegehalt geprüft.

---

[1]) Siehe Anm. 3 auf S. 443.
[2]) *Kissling*, Chem. techn. Wochenschr. 1917, S. 91.
[3]) *Halla*, Zeitschr. f. angew. Chem. 1907, S. 24.
[4]) *Arisz*, Kolloidchem. Beihefte VII, S. 1 bis 90.

Tabelle XIII.

Nr.	Gelatinegehalt Proz. bezogen auf die Trockensubstanz	Viskosität	Nr.	Gelatinegehalt Proz. bezogen auf die Trockensubstanz	Viskosität
1	13,6	1,8	15	31,0	6,1
2	15,0	2,1	16	31,0	5,4
3	15,0	2,9	17	31,0	6,9
4	16,3	1,8	18	34,0	6,5
5	16,5	2,6	19	34,2	6,9
6	18,4	2,6	20	36,1	7,2
7	20,0	3,0	21	37,5	8,0
8	20,2	2,6	22	37,6	7,5
9	26,1	4,6	23	39,0	9,0
10	26,2	4,3	24	39,0	7,5
11	28,1	5,6	25	40,4	9,7
12	28,7	4,2	26	41,2	11,4
13	30,2	5,8	27	41,1	10,0
14	30,1	5,0	28	41,2	11,6

Die Viskositätsbestimmung kann, wie aus Tabelle XIII zu ersehen ist, zu großen Irrtümern Anlaß geben. Beispiele:

1. Beim Stehenlassen einer leicht alkalischen Leimlösung bei Zimmertemperatur steigt die Viskosität rasch an, während der Gelatinegehalt infolge des Laugeabbaues ganz langsam geringer werden muß. *Trotzdem der Leim also tatsächlich schlechter wurde, steigt die Viskosität.* Bei einer Leimlösung, die in bezug auf die Trockensubstanz 15proz. war, betrug die Viskosität 6,9, nach zweistündigem Stehen 8,4; der Leim kann aber unmöglich durch bloßes Stehen 1,2mal besser geworden sein.

2. Wir erhielten z. B. bei den Leimsorten:

Tabelle XIV.

Nr.	Viskosität	Gelatinegehalt Proz.
8	2,6	20,2
21	8,0	37,5

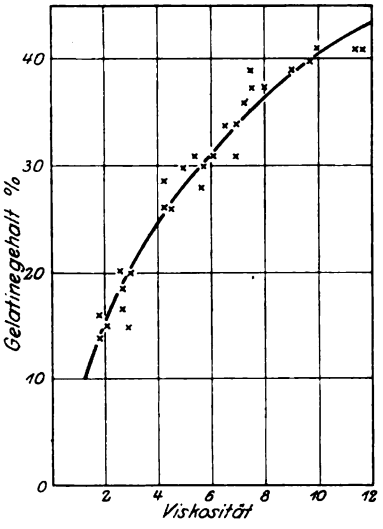


Abb. 11.

Würde man den Leim nach der Viskosität beurteilen, so wäre Leim Nr. 21 3,08mal besser als der Leim Nr. 8. Nach der Gelatinebestimmung aber ist Leim Nr. 21 nur 1,86mal besser. Tatsächlich hätte man aber der Kurve entsprechend beim Leim Nr. 8 eine Viskosität von 3,0, beim Leim Nr. 21 eine Viskosität von 8,6 erhalten sollen. Die Zähigkeit wurde aber durch verschiedene Faktoren, die nicht zu übersehen sind, verändert.

3. *Bei Leimsorten mit gleichem Gelatinegehalt erhielten wir verschiedene Viskositätszahlen, z. B.:*

Tabelle XV.

Nr.	Gelatinegehalt Proz.	Viskosität	Nr.	Gelatinegehalt Proz.	Viskosität
15	31,0	6,1	23	39,0	9,5
16	31,0	5,4	24	39,0	7,5
17	31,0	6,9			

Diese verschiedenen Viskositätszahlen bei gleichem Gelatinegehalt kamen zustande durch eine verschiedene Reaktion des Leimes, einen verschiedenen Aschengehalt und Alterserscheinungen, die infolge des verschiedenen Aschengehalts und der verschiedenen Reaktion verschieden schnell auftraten. p_H und Aschegehalt dieser Leime betrug:

Tabelle XVI.

Nr.	Aschegehalt Proz.	p_H	Nr.	Aschegehalt Proz.	p_H
15	2,32	7,9	23	4,11	8,2
16	3,45	8,3	24	1,76	7,1
17	1,61	6,6			

10. Ausführung der quantitativen Gelatinebestimmung.

a) Das Untersuchungsmaterial wird vorsichtig in Lösung gebracht. Blattgelatine zerschneidet man in etwa 2 qcm große Stücke, einen Teil einer Leimtafel zerschlägt man möglichst klein und läßt das Material in einem Becherglas mit entsprechend viel destilliertem Wasser von Zimmertemperatur gut durchquellen, und zwar Gelatine etwa ¼ Stunde, Leim nach Toluolzusatz mehrere Stunden. Die Auflösung erfolgt bei gut gequollenen Substanzen bei 40 bis 45° in etwa 15 Minuten. Die Konzentration ist bei Handelsgelatine 1- oder 2proz., bei Leim 5- oder 10proz. Den Prozentgehalt bezieht man auf wasserfreie Substanz; die Wasserbestimmung nimmt man vom zerkleinerten Material in 2 Stunden bei 110° vor, Lösungen gießt man auf gereinigten und geglühten Sand. Leim- und Gelatineprodukte haben etwa 15 Proz. Wasser.

b) Die Reaktion der Lösung wird auf empfindlichem Lackmuspapier geprüft. Die Lösungen werden vorsichtig mit verdünnter Salzsäure oder Natronlauge neutralisiert, bis sich rotes Lackmuspapier, das bei etwa $p_H = 7{,}0$ umschlägt, schwach zu bläuen beginnt. p_H der Lösungen soll zwischen $p_H = 7{,}0$ bis 7,5 liegen.

c) Die „neutralisierte" Lösung wird dann im Meßkolben auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Man mißt 10 ccm in ein Reagenzglas von 1,3 cm innerer Weite ab, bringt es in ein Wasserbad von 20 bis 22° auf etwa 1 Minute und stellt es dann in ein Wasserbad von genau 15°. Diese Temperatur muß während der Untersuchung konstant gehalten werden. Die Zeitmessung beginnt vom Einstellen des Reagenzglases in das Wasserbad von 15° mit Hilfe einer Stoppuhr oder einer gewöhnlichen Uhr mit Sekundenzeiger.

d) Die Lösung wird allmählich zähflüssiger und die Gelatinierung ist eingetreten, wenn die erstarrte „Lösung" aus dem umgekehrten Reagenzglas eben nicht mehr fließt. Man erfaßt das Glas oben mit Daumen und Zeigefinger der rechten Hand, dreht es um und läßt es durch seine eigene Schwere mit der unteren Kuppe des Glases auf den ausgestreckten Zeigefinger der linken Hand in einer Entfernung von etwa 3 cm auffallen. Fließt die Lösung gerade nicht mehr oder steigen keine Luftblasen mehr auf, so ist die Gelatinebestimmung zu Ende. Dieser Endpunkt ist leicht auf einige Sekunden genau zu treffen. Das Reagenzglas darf nur immer auf 1 bis 2 Sekunden aus dem Wasserbad von 15° hinausgenommen werden; je seltener und kürzer man es hinausnimmt, desto genauer die Analyse. Stets werden Doppelbestimmungen ausgeführt.

Die Gelatinierung soll zwischen 10 und 60 Minuten erfolgen. Tritt sie vor 10 Minuten ein, so wird die zu untersuchende Lösung entsprechend verdünnt; bei zu langer Gelatinierungszeit ist eine entsprechend konzentriertere Lösung herzustellen.

e) Die Berechnung der Gelatinekonzentration erfolgt nach der Gleichung

$$y = -0{,}55\,x + 1{,}8,$$

wobei y die Konzentration in Prozenten; x den Logarithmus der Minutenzahl (Gelatinierungszeit) bedeutet.

f) Beispiel: Ein Tafelleim hat 84,3 Proz. Trockensubstanz. Die 10proz. Lösung gelatinierte früher, als 10 Minuten und wurde deshalb dreimal verdünnt. Die Lösung ist jetzt 3,33proz. und in bezug auf die Trockensubstanz 2,81proz. Diese dreimal verdünnte Lösung gelatinierte in 25 Minuten; sie enthält der Formel entsprechend 1,03 Proz. Gelatine, bezogen auf die Lösung, und 36,65 Proz. Gelatine, bezogen auf die Trockensubstanz.

Der untersuchte Tafelleim enthält also 36,65 Proz. Gelatine.

Zusammenfassung.

1. Die bisherige Wertbestimmung einer Handelsgelatine oder einer Leimsorte mit Hilfe der Viskosität ist wenig brauchbar. Sie wird von den verschiedensten Faktoren, wie Reaktion (p_H), Alterserscheinungen, Salzgehalt, Inhomogenität usw. beeinflußt und ist dadurch fehlerhaft.

2. Das Charakteristikum einer Handelsgelatine oder eines Leimes ist die „gelatinierende Substanz". Handelsgelatine hat 70 bis 100, Leim 10 bis 40 Proz. „Gelatine".

3. Es wird der Zusammenhang zwischen Gelatinierungszeit und p_H der Lösung beschrieben.

a) Die Kurve entspricht der Dissoziationskurve der Gelatine und zeigt einen scharfen Wendepunkt zwischen $p_H = 4{,}6$ bis 5,9. Je aschearmer ein Material ist, desto näher liegt der Umkehrpunkt bei $p_H = 4{,}6$.

b) Zwischen $p_H = 7{,}0$ bis 7,5 flacht sich die Kurve ab und geht mit der Abszissenachse praktisch parallel. Die Gelatinebestimmung wird in diesem p_H-Gebiet ausgeführt.

4. Die Gelatinierungszeit steht mit der Konzentration der Lösung in einem leicht zu übersehenden Zusammenhang und entspricht der Formel

$$y = -0{,}55\,x + 1{,}8,$$

wobei y die Konzentration der Lösung in Prozenten, x den Logarithmus der Minutenzahl (Gelatinierungszeit) bedeutet. Die Gelatinekonzentration wird auf den Gelatinegehalt einer Standardgelatine bezogen, die von etwa 60 untersuchten Handelsgelatinesorten den höchsten Gelatinegehalt hatte.

5. Es wird eine Methode zur Bestimmung des Gelatinegehalts angegeben, die bei einer Gelatinierungszeit zwischen 10 bis 60 Minuten, in einer Fehlergrenze von maximal 2 Proz., übereinstimmende Resultate ergibt.

Über die Synthese des d,l-2,4-Dioxyphenylalanins (d,l-Resorcylalanins).

Von

Kinsaburo Hirai.

(Aus der Kinderklinik der medizinischen Akademie zu Nagasaki.)

(Eingegangen am 21. August 1926.)

Es gibt verschiedene Methoden der Synthese von aromatischen Aminosäuren, wie die altbekannte *Erlenmeyer*sche Synthese[1]), *E. Fischer*sche Malonestersynthese[2]), *Sörensen*sche Synthese mit Phthalimidkalium[3]), *Wheeler* und *Hoffmann*sche Hydantoinmethode[4]) usw. Die *T. Sasaki*sche Glycinanhydrid-methode[5]) wurde wegen ihrer Einfachheit vielfach als eine sehr gute allgemein anwendbare Methode warm empfohlen. Seine Methode hat auch den großen Vorteil, wie schon von ihm betont wurde, daß sie auch bei der Synthese von solchen Aminosäuren anwendbar ist, die einen gegen hydrolysierende Mittel empfindlichen Kern, z. B. den eines Polyphenols, besitzen; denn die Reduktion und hydrolytische Spaltung geht dabei in einer Operation vor sich. Durch die Anwendung seiner Methode hat *Sasaki* schon manche biochemisch sehr wichtige Aminosäuren, wie d,l-Phenylalanin, d,l-Tyrosin[5]), d,l-Naphthyl- alanin[6]), d,l-Furylalanin[7]), synthetisch bereiten können. Er hat auch mich veranlaßt, nach seiner Methode Glycinanhydrid mit Vanillin zu kondensieren und nach Spaltung mit Jodwasserstoffsäure das bis dahin ziemlich schwer zugängliche, jedoch wissenschaftlich in vielen Beziehungen interessante d,l-3,4-Dioxyphenylalanin synthetisch darzustellen. Nach Publikation meiner Arbeit über die Synthese dieser Aminosäure vom Brenzkatechinkern[8]) aus habe ich es unternommen,

---

[1]) *E. Erlenmeyer jun.*, Ann. **275**, 1, 1893.
[2]) *E. Fischer*, Ber. **37**, 3062, 1904.
[3]) *Sörensen*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 448, 1905.
[4]) *Wheeler* und *Hoffmann*, Amer. chem. Journ. **45**, 368, 1911.
[5]) *Takaoki Sasaki*, Ber. **54**, 163, 1921.
[6]) *Takaoki Sasaki* und *Jiro Kinose*, diese Zeitschr. **121**, 171, 1921.
[7]) *Takaoki Sasaki*, Ber. **54**, 2056, 1921.
[8]) *Kinsaburo Hirai*, diese Zeitschr. **114**, 67, 1921.

nach dieser Methode auch das isomere d, l-2, 4-Dioxyphenylalanin (d, l-Resorcylalanin) zu synthetisieren. Nach langjähriger Unterbrechung habe ich vor kurzem meine Arbeit wieder aufgenommen.

Den *Resorcylaldehyd*, der dank der *Gattermann*schen Aldehydsynthese ziemlich leicht aus Resorcin und wasserfreier Blausäure erhältlich ist, kondensierte ich direkt mit Glycinanhydrid und spaltete mit Jodwasserstoffsäure. Ich konnte dadurch nichts gewinnen. Erst durch Besetzung der Hydroxylgrupppen des Resorcylaldehyds mit Methylresten ging der Prozeß ganz glatt vor sich. Das Kondensationsprodukt von Resorcylaldehyd-dimethyläther mit Glycinanhydrid, das sich gut aus Eisessig umkristallisieren ließ, wurde mit Jodwasserstoffsäure gespalten. Das d, l-2, 4-Dioxyphenylalanin hat in vielen biochemischen Beziehungen Interesse; genaue Kenntnis des chemischen Charakters dieser Aminosäure mag zum Auffinden solcher Aminosäuren in der Natur eventuell wichtige Dienste leisten.

Vor allem interessierten uns die leicht oxydierbaren und die chemisch noch nicht exakt definierbare Farbstoffe bildenden Dioxyphenylalanine. Zwei von diesen, nämlich d, l-3, 4-Dioxyphenylalanin und d, l-2, 4-Dioxyphenylalanin, darzustellen ist mir geglückt; es bleibt nur noch ein anderes Isomeres, das d, l-2, 5-Dioxyphenylalanin, zu gewinnen übrig. Die Darstellung desselben und Experimente über die biologische und pharmakodynamische Wirkung des d, l-2,-4-Dioxyphenylalanins sind im Gange.

Experimenteller Teil.

1. Versuch zur Kondensation von Glycinanhydrid oder Hydantoin mit Resorcylaldehyd.

Den Resorcylaldehyd stellte ich nach der *Gattermann*schen Methode[1]) aus Resorcin und wasserfreier Blausäure dar. Das Gemisch von 15,1 g Resorcylaldehyd, 5,0 g Glycinanhydrid, 14,3 g Natriumacetat und 22,3 g Essigsäureanhydrid wurde, wie üblich, 6½ Stunden lang im Ölbad auf 160 bis 170° C erhitzt; nach dem Erkalten wurde das rötlichschwarze Reaktionsgemisch zuerst mit heißem Wasser, dann mit Alkohol gewaschen und darauf fein pulverisiert. Nach der Extraktion dieses Pulvers mit Eisessig und sodann mit heißem Wasser wurde das Kondensationsprodukt mit Jodwasserstoffsäure gespalten. 8 g Kondensationsprodukt, 35 ccm Jodwasserstoffsäure ($D = 1{,}7$) und 3,0 g roter Phosphor wurden in zwei Portionen geteilt, in einem Rundkolben 8 Stunden lang mit Rückflußkühler gekocht und nach dem Erkalten vom roten Phosphor abfiltriert. Das klare Filtrat wurde mit verdünnter Essigsäure angesäuert und mit 20proz. Bleiacetatlösung gefällt, wieder abfiltriert und das klare, farblose Filtrat mit Ammoniak versetzt. Der

[1]) *Gattermann*, Ber. **32**, 278, 1899.

blaßrote flockige Niederschlag wurde abgenutscht und in wenig Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach dem Abfiltrieren von Bleisulfid wurde das Filtrat unter vermindertem Druck mit Wasserstoffdurchleitung stark eingeengt; der Rückstand wollte auch nach langem Stehen nicht kristallisieren.

Durch Kondensation von Resorcylaldehyd mit Hydantoin konnte ich gleichfalls kein nennenswertes Resultat erhalten.

2. Di-2, 4-methoxybenzalglycinanhydrid,

$$(OCH_3)_2{-}C_6H_3{-}CH{=}C{<}\begin{matrix}CO{-}NH\\NH{-}CO\end{matrix}{>}C{=}CH{-}C_6H_3{-}(OCH_3)_2.$$

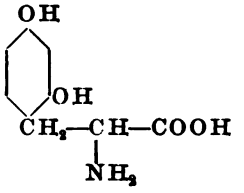
Den Resorcylaldehyddimethyläther erhielt ich durch Methylierung von Resorcylaldehyd mit Jodmethyl[1]) oder Dimethylsulfat.

Nach der Vorschrift von *T. Sasaki* mischte ich 1 g getrocknetes feinpulverisiertes Glycinanhydrid, 3,5 g Resorcylaldehyd-dimethyläther, 2,4 g wasserfreies Natriumacetat und 4,4 g Essigsäureanhydrid in einem Rundkolben; dieses Gemenge wurde nunmehr 7 Stunden lang im Ölbad von 160 bis 170° C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser aufgenommen und nach dem Abnutschen mehrmals mit Alkohol gewaschen. Der Rückstand war eine kristallinische Substanz von goldgelber Farbe und wog nach der Trocknung im Vakuumexsikkator über Phosphorsäureanhydrid 3,0 g. Mithin war die Ausbeute 83,3 Proz. der Theorie. Nach einmaligem Umkristallisieren aus heißem Eisessig erhielt ich schöne blaßgelbe, viereckige Prismen, die bei 286 bis 287° C (unkorrigiert) schmolzen.

0,1442 g Substanz n/10 NH_3 7,06
0,1011 g „ 0,2391 g CO_2 und 0,0474 g H_2O

$C_{22}H_{22}O_6N_2$	Ber. Proz.	Gef. Proz.
C	64,36	64,49
H	5,44	5,24
N	6,83	6,86

3. Spaltung des Di-2, 4-methoxybenzal-glycinanhydrids zu d, l-2, 4-Dioxyphenylalanin.



4 g Kondensationsprodukt, 20 ccm Jodwasserstoffsäure ($D = 1{,}7$) und 1 g roter Phosphor wurden in einem Rundkolben unter Rückfluß-

[1]) *Tiemann* und *Parrisius*, Ber. 18, 2370, 1880.

kühlung 8 Stunden lang gekocht. Nach dem Erkalten wurde die Lösung mit Wasser verdünnt und filtriert; das klare Filtrat wurde mit 20 ccm Eisessig angesäuert. Wie bei der Darstellung von d, l-3, 4-Dioxyphenylalanin, versetzte ich mit 20proz. Bleiacetatlösung. Das klare, farblose Filtrat wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht und die dabei entstandene farblose, amorphe Masse nach dem Abnutschen sowie Waschen mit Wasser in wenig Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach der Vertreibung von Schwefelwasserstoff durch einen Kohlensäurestrom wurde filtriert und das Bleisulfid mit H_2O nachgewaschen. Die klare und farblose Lösung wurde unter vermindertem Druck mit Kohlensäuredurchleitung stark eingeengt und der dabei entstandene Rückstand mit schweflige Säure enthaltendem Wasser erwärmt und filtriert. Nach dem Erkalten fielen schöne, fast farblose Kristalle (viereckige Tafeln) aus. Diese wurden scharf abgenutscht und mit wenig eisgekühlten Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator über Phosphorsäureanhydrid getrocknet. Die Substanz wog 1,8 g nach der Trocknung, mithin betrug die Ausbeute 47 Proz. der Theorie.

Zur Analyse wurde die Substanz nochmals aus dem schweflige Säure enthaltenden Wasser umkristallisiert; die Substanz schmolz dann bei 223 bis 224° C (unkorrigiert) unter Zersetzung.

0,1510 g Substanz n/10 NH_3 7,63
0.1273 g „ 0,2551 g CO_2 und 0,0636 g H_2O

$C_9H_{11}O_4N$	Ber. Proz.	Gef. Proz.
C	54,80	54,65
H	5,63	5,59
N	7,10	7,07

Das d, l-2, 4-Dioxyphenylalanin war leicht löslich in Wasser, aber schwer löslich in Aceton, Äther, Chloroform und Alkohol und reagierte neutral gegen Lackmuspapier. Die wässerige Lösung färbte sich schwach blau beim Zusatz von Ammoniak und dunkel grünlich-violett beim Zusatz von Eisenchloridlösung.

Die Genauigkeit der Bangschen Mikro-Blutlipoidbestimmung.

Von

Alfred Fleisch.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 24. August 1926.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Analyse des Blutes auf seinen Lipoid- und Fettgehalt wird voraussichtlich eine häufige Untersuchungsmethode der Biochemie und der Klinik werden; einerseits wegen der zunehmenden Bedeutung von Cholesterin und Lecithin und andererseits wegen der Erforschung des Fettstoffwechsels. Aber für die Entwicklung einer Forschungsrichtung spielt immer die Bequemlichkeit und Genauigkeit der vorhandenen Methoden eine sehr wichtige Rolle. Für die quantitative Bestimmung der Blutlipoide stehen heute hauptsächlich zwei Methoden in Konkurrenz, nämlich die schon häufig verwendete *Bloor*sche Methode, die etwa 1 ccm Blut erfordert und auf Nephelometrie beruht, und die von *Bang*[1]) inaugurierte Mikroanalyse, für deren relativ einfache Durchführung nur etwa 100 mg Blut erforderlich sind. Nach den Befunden von *Bang* an Trioleinlösungen mit 0,037 bis 0,935 mg Triolein ist die Genauigkeit eine gute, indem der Fehler in 70 Proz. der Versuche innerhalb 0,01 mg Triolein liegt.

Damit ist natürlich durchaus nicht gesagt, daß sich die Methode bei der Verwendung von Blut als Ausgangsmaterial ebenso bewährt wie an einer reinen Trioleinlösung. Tatsächlich ist denn auch von *J. Maas*[2]) eine beinahe vernichtende Kritik dieser *Bang*schen Mikromethode veröffentlicht worden. Als ein Hauptfehler wird von *J. Maas* das Ablösen von Fäserchen von den Papierblättchen bezeichnet, indem jede organische Verunreinigung bei der Analyse als Fett erscheint. Als zweiten Hauptfehler betrachtet *Maas* die inkonstante Temperatur, bei der die Oxydation des Fettes sich zu vollziehen hat. Auch mit reiner Trioleinlösung ist es *Maas*, angeblich bei exaktestem Arbeiten, nicht geglückt, regelmäßig brauchbare Resultate

[1]) *Ivar Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung. München, Bergmann, 1922.

[2]) *J. Maas*, diese Zeitschr. 144, 379, 1924.

zu erhalten. Von ähnlichen schlechten Erfahrungen berichtet auch *H. Forster*[1]), und *Bing* und *Heckscher*[2]) beurteilen die *Bang*sche Methode infolge der vielen Fehlerquellen als schwierig anwendbar.

Da durch die obigen Urteile die *Bang*sche Methode als erledigt betrachtet werden könnte, halte ich es für angebracht, über meine sehr zahlreichen Blutfettanalysen mit dieser Methode zu berichten, indem meine Erhebungen den schlechten Erfahrungen von *Maas* und *Forster* widersprechen. Allerdings waren meine ersten Analysen auch mit großen Fehlern behaftet, die sich aber stark reduzierten, sobald die verschiedenen Fehlerquellen erkannt und eliminiert wurden. Nachdem die Methode einmal erlernt war, wurde die von *Bang*[3]) angegebene Genauigkeit nicht nur erreicht, sondern sogar wesentlich übertroffen.

Da in einigen Punkten im Interesse größerer Genauigkeit kleinere Abweichungen von der *Bang*schen Vorschrift gehandhabt wurden, so soll die Methode kurz angedeutet werden.

Die vorgängige Reinigung der Papierblättchen geschah nicht durch Extraktion mit kochendem Alkohol, sondern durch zweimalige mehrstündige Extraktion mit Petroläther. Die Auffaserung des Papiers ist dabei geringer. Starkes Schütteln der Papierblättchen im Extraktionsmittel, wie *Forster* anratet, ist zu vermeiden, da gerade dadurch das Papier stark auffasert. Vor der Verwendung wird das Papierblättchen beidseitig kurz abgeblasen, um lose anhaftende Fäserchen zu entfernen. Beim Aufsaugen des Blutes sollen die Ränder und namentlich die Ecken des Papierblättchens mit Blut getränkt werden, da hier am ehesten Fasern abfallen, die durch das eintrocknende Blut fest verklebt werden. Die vollständig lufttrockenen Blutblättchen werden mit 8 ccm nochmals destillierten Petroläthers (Siedepunkt 50 bis 70°) 10 Minuten lang extrahiert. Diese Extraktionszeit genügt vollständig, indem eine nochmalige Extraktion keine Lipoide mehr herausbringt. Das Blutblättchen wird mit ausgeglühtem Platindraht entfernt, dem Petroläther 1 ccm 1proz. Natronlauge zugesetzt.

Selbstverständlich müssen die verwendeten Probierröhrchen absolut rein sein. Sie werden vor Gebrauch mit einem heißen Chromsäure-Schwefelsäuregemisch gereinigt, dann gründlich mit Brunnenwasser und zuletzt mit destilliertem Wasser gespült und mit der Öffnung nach abwärts getrocknet, ohne sie aber auf einen Holzzapfen zu stecken.

Für die Abdampfung des Petroläthers ist das von *Bang* empfohlene Sandbad wenig geeignet. Statt dessen verwendete ich einen elektrischen Ofen von etwa 600 Watt, wie er für die Heizung von kleinen Zimmern verwendet wird. Der Deckel des Ofens war mit Löchern versehen, in welche gleichzeitig 12 Probierröhrchen versenkt werden können. Nur der oberste Zentimeter der etwa 40 ccm fassenden Probierröhrchen ragt aus dem Ofen heraus. Ein Überkriechen des Petroläthers ist dabei vollständig ausgeschlossen, da die Temperatur im oberen Teil des Probierröhrchens wesentlich höher ist als im unteren Teil. Durch Isolierung des elektrischen Ofens gegen Wärmeverlust nach außen steigt die Lufttemperatur im Ofen auf

---

[1]) *H. Forster*, diese Zeitschr. **146**, 562, 1924.
[2]) *Bing* und *Heckscher*, ebendaselbst **149**, 79, 1924.
[3]) *I. Bang*, ebendaselbst **91**, 86, 1918.

etwa 120°, so daß das Abdampfen des Petroläthers nach ½ Stunde in der Hauptsache beendigt ist. Um mit Sicherheit die letzten Spuren des Petroläthers zu entfernen, werden die Probiergläser sofort bei Herausnahme aus dem Ofen durch die nichtrußende Flamme gezogen, bis die im Probierglas noch vorhandene Natronlauge auf die Hälfte eingedampft ist. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird genau 1 ccm n/10 Chromsäure (chemisch rein) zugesetzt und wieder gewartet, bis Zimmertemperatur erreicht ist.

Spezielle Sorgfalt erfordert der Zusatz von 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure. Es darf nur konzentrierte Schwefelsäure pro analysi verwendet werden, aber auch da sind die Qualitäten sehr verschieden. Der Blindwert der Lösungen rührt hauptsächlich von der nie ganz reinen Schwefelsäure her. Es soll nur Schwefelsäure verwendet werden, die sichtlich keine Verunreinigungen zeigt und deren Blindwert nicht größer ist, als 0,05 ccm Chromsäureverbrauch entspricht. Die Schwefelsäure soll möglichst wenig mit Luft in Berührung kommen, um ihre Verunreinigung mit Staub und ihre Verdünnung zu verhindern. Auch die Geschwindigkeit des Schwefelsäurezuflusses ist von Einfluß. Deshalb muß die Schwefelsäure aus einer Bürette mit nicht gefettetem Hahn bei allen Versuchen mit derselben Geschwindigkeit in die Mitte des Probierglases einfließen. Während und nach dem Schwefelsäurezufluß darf das Probierglas nicht auf einen guten Wärmeleiter gestellt werden, da die Höhe der Temperatur nach Schwefelsäurezusatz mitbedingend ist für die Menge der verbrauchten Chromsäure. Nach dem Schwefelsäurezusatz muß das Probierglas geschüttelt und auch seine inneren Wände müssen möglichst hoch hinauf mit der Schwefelsäure benetzt werden, da Bruchteile des Fettes an den Wänden haften. Umsonst habe ich versucht, durch künstliche Regulierung der Temperatur für die Fettoxydation bessere Resultate zu erzielen. Jeder Eingriff machte die Resultate schlechter.

Nach dem Schwefelsäurezusatz werden die Probierröhrchen mindestens 15 Minuten lang im Holzgestell sich selbst überlassen, dann mit destilliertem Wasser verdünnt, der Inhalt in einen Erlenmeyer gegossen, die Probierröhrchen dreimal nachgespült bis zu einem Gesamtvolumen von etwa 150 ccm. Bis dahin ist mit Vorteil darauf zu achten, daß die Probiergläschen, wenn immer möglich, zugedeckt sind, um das Hineinfallen von Staub zu verhindern; denn jede organische Verunreinigung verbraucht Chromsäure und erscheint folglich bei der Analyse als Fett. Nach Zusatz von 1 ccm 5proz. Jodkaliumlösung und einigen Tropfen Stärkelösung wird mit n/10 Thiosulfatlösung auf 0,005 ccm genau titriert, bis zum Verschwinden der blauen Farbe.

Die Berechnung geschieht nach der Vorschrift von *Bang*, wobei der Blindwert der Lösungen von der zugesetzten Menge Chromsäure zu subtrahieren ist. Bei Verwendung von reiner Schwefelsäure und sauberem Arbeiten entspricht der Blindwert der Lösungen nur etwa 0,03 ccm Chromsäure und variiert innerhalb Wochen gewöhnlich nur um ± 0,005 ccm.

Bei Serienbestimmungen entfällt auf eine Analyse nur eine Arbeitszeit von etwa 10 Minuten.

Versuche an einer Trioleinlösung.

Nachdem die Methode einmal erlernt war, wurden 34 Analysen von durchschnittlich je 0,089 mg Triolein ausgeführt. Der durch die *Bang*sche Analyse gefundene Wert wird in Prozenten des für den betreffenden Versuch

berechneten Oleingehalts ausgedrückt. Diese Resultate sind in der Statistik von Tabelle I wiedergegeben und werden einer fehlerrechnerischen Behandlung unterzogen, die entsprechend den Angaben von *Fueter*[1]) ausgeführt wird. Die einzelnen Fälle werden in Klassen von der Breite $w = 2$ (d. h. Fehler von 2 Proz.) eingeteilt und abgezählt, wieviel Fälle $f(x)$ in jede Klasse zu liegen kommen. Jeder Klasse wird eine Nummer x gegeben.

Tabelle I.

Klasse Proz.	x	$f(x)$	$x \cdot f(x)$	$x^2 \cdot f(x)$
91— 93	— 4	1	— 4	16
93— 95	— 3	1	— 3	9
95— 97	— 2	3	— 6	12
97— 99	— 1	3	— 3	3
99—101	0	10	0	0
101—103	+ 1	11	+ 11	11
103—105	+ 2	4	+ 8	16
105—107	+ 3	0	0	0
107—109	+ 4	0	0	0
109—111	+ 5	0	0	0
111—113	+ 6	1	+ 6	36
		$n = 34$	$\Sigma x f(x) = +9$	$\Sigma x^2 \cdot f(x) = 103$

Die Dispersion σ (= mittlerer Fehler) der Versuchsreihe berechnet sich nach der Formel:

$$\sigma^2 = \frac{w^2}{n} \sum x^2 f(x) - b,$$

wobei n die Gesamtzahl der Beobachtungen und b ein Korrekturglied darstellt von der Größe

$$b = \frac{w}{n} \sum x \cdot f(x) = \frac{2}{34} \cdot 9 = 0{,}53.$$

Die Berechnung ergibt für die Dispersion

$$\sigma = 3{,}44 \text{ Proz.}$$

In einer einwandfreien Statistik müssen zwei Drittel der Fälle innerhalb der Dispersion liegen. Die drei Klassen mit den Nummern — 1,0 und + 1 enthalten $^{24}/_{34}$, also mehr als zwei Drittel der Fälle.

Auf Grund der gefundenen Dispersion läßt sich über die Genauigkeit der *Bang*schen Fettanalyse folgendes aussagen:

Für eine Mikromethode repräsentiert eine *Dispersion von nur 3,44 Proz. eine gute Präzision*, namentlich wenn man bedenkt, daß diese 3,44 Proz. einer Trioleinmenge von nur $3 \cdot 10^{-6}$ g entsprechen. Die schlechten Erfahrungen, über die andere Autoren berichten, sind somit nicht der Methode zur Last zu legen.

---

[1]) *R. Fueter*, Das mathematische Werkzeug des Chemikers, Biologen und Statistikers, S. 229. Zürich, Orell Füssli, 1926.

Die gefundene Dispersion imponiert durch ihre Kleinheit noch mehr, wenn sie in Vergleich gesetzt wird mit dem Titrationsfehler. Es wurde mit Thiosulfat auf 0,005 ccm genau titriert. 0,005 ccm Thiosulfat entsprechen aber schon einer Fettmenge von $2 \cdot 10^{-6}$ g und einem Fehler von 2,2 Proz. Der Hauptfehler liegt somit in der ungenauen Titration. Alle anderen Fehlerquellen konnten auf eine nur noch nebensächliche Bedeutung reduziert werden.

Der von *Bang* empirisch gefundene Wert, daß 1 mg Triolein 2,45 ccm Chromsäurelösung verbrauchen, entspricht auch meinen Befunden, indem bei Annahme dieses Wertes das arithmetische Mittel sämtlicher Bestimmungen nur um 0,2 Proz. größer ist als die berechnete Menge Triolein.

Versuche an Blut.

Wenn auch die Mikrolipoidbestimmung an einer Trioleinlösung sehr exakte Resultate gibt, so braucht dasselbe für die Verwendung von Blut als Ausgangssubstrat noch nicht der Fall zu sein. Denn das Aufsaugen des Blutes, das Trocknen der Blättchen und die Fettextraktion können neue eventuell große Fehler einführen. Darüber kann nur die fehlerrechnerische Behandlung einer größeren Versuchsreihe Aufschluß geben. Ein geeignetes Vorgehen wäre, an ein und demselben Blute, das immer denselben Lipoidgehalt aufweisen müßte, eine große Zahl von Analysen durchzuführen, um dann die Dispersion wie in der Statistik von Tabelle I zu berechnen. Ich wählte einen anderen Weg, der spezielle, nur für die Dispersionsberechnung anzustellende Versuche überflüssig machte.

Anläßlich Untersuchungen über die hormonale Beeinflussung des Blutlipoidgehalts, worüber in einer folgenden Arbeit berichtet wird, wurden etwa 2500 Analysen durchgeführt. Darunter sind 884 Analysen, die als Doppelbestimmungen ausgeführt wurden. Diese 442 Doppelbestimmungen stellen an sich ein reichlich genügendes Material dar, um die Präzision der Methode zu bestimmen. Der üblichen Fehlerrechnung stellt sich aber eine Schwierigkeit entgegen, indem jeder Doppelbestimmung ein anderer Lipoidgehalt des Blutes zugrunde liegt. Ich habe früher gezeigt[1]), auf welche Weise an einem solchen Material mit Doppelbestimmungen einer *variablen* Unbekannten die Fehlerrechnung ausgeführt werden kann. In bezug auf die Berechnung selbst verweise ich auf die zitierte Abhandlung und gebe hier nur die Resultate.

Die Mikrolipoidbestimmung wurde am Gesamtpetrolätherextrakt des aus der Ohrvene entnommenen Kaninchenbluts ausgeführt; es wurde somit von den Gesamtlipoiden nur Fett und Cholesterin, aber diese gemeinsam bestimmt. Bei diesem Vorgehen beträgt die Dispersion der Einzelanalyse $\sigma = 5{,}14 \cdot 10^{-6}$ g Lipoidsubstanz.

Wie in der früheren Arbeit gezeigt wurde, ist die Beobachtungsreihe dieser 442 Doppelbestimmungen vom Gesichtspunkt der mathematischen Wahrscheinlichkeit aus einwandfrei, indem mehr als zwei Drittel der beobachteten Fehler innerhalb dieser Dispersion liegen. Ferner stimmt die Fehlerkurve der Beobachtungsreihe sehr gut mit der theoretischen *Gauß*schen Fehlerkurve überein, was das Hauptkriterium für eine einwandfreie

[1]) *A. Fleisch*, diese Zeitschr. **177**, 375, 1926.

Beobachtungsreihe darstellt. Daraus resultiert, daß alle gemachten Fehler zufälliger Natur sind, und daß zu verschiedenen Zeiten der Untersuchungen die Genauigkeit immer annähernd dieselbe gewesen ist, obwohl Reagenzien und Untersucher gewechselt hatten. Hingegen ist es nicht möglich, auf Grund der Fehlerrechnung zu entscheiden, ob die *Bang*sche Methode wirklich die wahren Werte des Blutlipoidgehalts gibt. Diese Frage wäre von wesentlichem Interesse, da die *Bloor*sche Methode im Vergleich zur *Bang*schen wesentlich höhere Werte gibt. So findet *Horiuchi*[1]) im Kaninchenblut nach *Bloor* 0,28 bis 0,34 Proz. Fettsäuren und 0,10 bis 0,11 Proz. Cholesterin, während in meinen Versuchen der durchschnittliche Gehalt an Fett plus Cholesterin nur 0,0768 Proz. beträgt.

Da in den jeweils untersuchten 100 mg Blut der durchschnittliche Lipoidgehalt sämtlicher Doppelbestimmungen $76{,}8 \cdot 10^{-6}$ g betrug, so entspricht die gefundene Dispersion einem mittleren Fehler von 6,7 Proz. Bei Verwendung von Blut als Ausgangssubstrat ist also der mittlere Fehler beinahe doppelt so groß als bei Analyse einer Trioleinlösung. Diese Vergrößerung der Dispersion geht natürlich zum Teil zu Lasten der Methode. Die Blutentnahme selbst gibt zu Fehlern Anlaß, obwohl das Kaninchenohr vorher mit Petroläther gereinigt wird. Dann summieren sich sämtliche Fehler, die beim zweimaligen Abwägen der Blättchen, ferner beim Trocknen und bei der Extraktion entstehen. Aber zweifellos ist ein Teil der Dispersionserhöhung nicht durch die Methode selbst bedingt. Bei der Fehlerrechnung wurde nämlich die einzig mögliche Voraussetzung gemacht, daß den beiden Einzelanalysen einer Doppelbestimmung genau derselbe Blutlipoidgehalt zugrunde liege, und das ist selbstverständlich nicht immer der Fall. Namentlich dann, wenn die Vene bei der ersten Blutentnahme noch gut, bei der zweiten hingegen schlecht blutet, und langsam Tröpfchen für Tröpfchen herausgepreßt werden muß, ist es sehr wahrscheinlich, daß der Lipoidgehalt verschieden ist. Bei der Fehlerrechnung erscheinen aber solche effektive Verschiedenheiten des Blutlipoidgehalts als gemachte Analysenfehler. Deshalb ist die berechnete Dispersion von 5,14 zweifellos zu groß, aber eine rechnerisch begründete Korrektur läßt sich nicht anbringen. Wir sind deshalb auf eine Schätzung angewiesen. Wenn wir die Zunahme der Dispersion von 3 auf $5{,}14 \cdot 10^{-6}$ g bei der Analyse von Blutlipoiden anstatt von Triolein zur Hälfte dem vergrößerten Analysenfehler und zur Hälfte dem effektiv verschiedenen Blutlipoidgehalt zur Last legen, so beträgt die *Dispersion der methodischen Fehler etwa* $4 \cdot 10^{-6}$ *g = 5,2 Proz. des Blutlipoidgehalts. Das ist zweifellos eine gute Präzision*, die die *Bang*sche Mikrolipoidbestimmung als sehr empfehlenswerte Methode erscheinen läßt.

Es wurde im weiteren noch untersucht, in welcher Weise die *Dispersion abhängig ist von dem absoluten Lipoidgehalt des Blutes.* Hierfür wurden die Doppelbestimmungen in zwei Gruppen aufgestellt. Die erste Gruppe enthält diejenigen Doppelbestimmungen, deren arithmetische Mittel niedriger sind als $90 \cdot 10^{-6}$ g Lipoid, die zweite Gruppe bekommt die Fälle mit größerem arithmetischen Mittel. Die Resultate sind aus der Tabelle II ersichtlich, wobei zu vergegenwärtigen ist, daß die in Tabelle II aufgeführten Dispersionen nicht nur die reinen Methodefehler, sondern auch effektive Verschiedenheiten des Blutlipoidgehalts der beiden Einzelanalysen einer Doppelbestimmung umfassen.

---

[1]) *Y. Horiuchi*, Journ. of biol. Chem. 44, 345, 1920.

Tabelle II.

Fälle, deren arithmetische Mittel	Zahl der Fälle	Durchschnittl. Lipoidgehalt in 10^{-6} g	Extremste Werte in 10^{-6} g	Dispersion in 10^{-6} g Lipoid	Dispersion in Proz. des durchschnittl. Lipoidgehalts
unter $90 . 10^{-6}$ . .	678	65	39— 90	4,55	7,0
Sämtliche Fälle .	884	76,8	39—217	5,14	6,7
über $90 . 10^{-6}$ . .	206	115	90—217	6,66	5,8

Mit zunehmendem Lipoidgehalt der Blutprobe steigt somit der mittlere absolute Fehler an, aber die Vergrößerung der Dispersion ist nicht einfach proportional der Vermehrung des Lipoidgehalts. Dies ist daraus ersichtlich, daß die Dispersion in Prozenten des durchschnittlichen Lipoidgehalts ausgedrückt mit zunehmendem Lipoidgehalt kleiner wird.

Wenn der durchschnittliche Lipoidgehalt von Tabelle II als Abszisse und die zugehörige Dispersion als Ordinate aufgetragen wird, so gibt die Verbindung der Ordinatenpunkte eine gerade Linie, welche die y-Achse im Ordinatenabstand $+ 2$ schneidet. Dieser Wert von $+ 2 . 10^{-6}$ g ist die extrapolierte Dispersion für einen Lipoidgehalt von Null und entspricht gerade dem oben berechneten Titrationsfehler von $2 . 10^{-6}$ g. Wenn wir die zweifellos vernünftige Annahme machen, daß die effektive Verschiedenheit im Blutlipoidgehalt der beiden zu *einer* Doppelbestimmung gehörenden Einzelanalysen im Durchschnitt proportional ist zum absoluten Lipoidgehalt, so läßt sich die allgemeine Beziehung zwischen Lipoidgehalt L und der zugehörigen Dispersion σ folgendermaßen berechnen (Abb. 1):

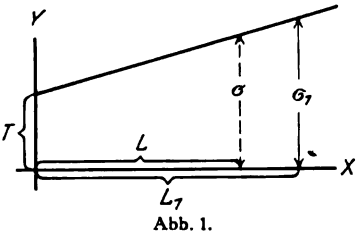


Abb. 1.

T = konstanter Titrationsfehler = $2 . 10^{-6}$ g, $\sigma_1 = 4 . 10^{-6}$ g = gefundene Dispersion infolge methodischer Fehler bei einem Lipoidgehalt des Blutes von $L_1 = 76{,}8 . 10^{-6}$. σ = gesuchte Dispersion infolge methodischer Fehler bei einem beliebigen Lipoidgehalt L.

$$\frac{\sigma - 2 . 10^{-6}}{\sigma_1 - 2 . 10^{-6}} = \frac{L}{L_1}.$$

$$\sigma = 0{,}026\, L + 2 . 10^{-6}.$$

Diese Gleichung für die Dispersion gilt natürlich nur für ungefähr den Bereich von L, welcher meiner Versuchsreihe zugrunde liegt.

Der größte Teil der Lipoidanalysen wurde von den beiden Volontärinnen Fräulein *L. Ziegler* und Fräulein *N. Birenstihl* ausgeführt, denen ich meinen besten Dank ausspreche.

Zusammenfassung.

Eine große Serie von Blutlipoidbestimmungen nach der Mikromethode von *Bang* wird der fehlerrechnerischen Behandlung unterworfen und der mittlere Versuchsfehler (= Dispersion) berechnet.

Bei Analyse von durchschnittlich je $89 \cdot 10^{-6}$ g Olein beträgt die Dispersion $3 \cdot 10^{-6}$ g = 3,44 Proz.

Bei der Verwendung von Kaninchenblut als Substrat, das einen mittleren Lipoidgehalt von $76{,}8 \cdot 10^{-6}$ g (Fett + Cholesterin) enthält, beträgt die Dispersion $4 \cdot 10^{-6}$ g = 5,2 Proz.

Die Größe der Dispersion σ variiert mit der zu bestimmenden Lipoidmenge L entsprechend der Formel

$$\sigma = 0{,}026\, L + 2 \cdot 10^{-6}.$$

Die *Bang*sche Mikrolipoidbestimmung besitzt somit eine hohe Konstanz ihrer Resultate.

Die hormonale Beeinflussung des Blutfettgehalts.

Von

Alfred Fleisch.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 24. August 1926.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Die große Bedeutung, die der Blutzuckerspiegel für die Erforschung des Diabetes und des Kohlehydratstoffwechsels erlangt hat, läßt das in den letzten Jahren zunehmende Interesse für den Fettgehalt des Blutes begreiflich erscheinen. Denn es besteht die Hoffnung, mit Hilfe des Blutfettgehalts und seinen Beeinflussungen Verständnis für den Fettstoffwechsel und seine Regulierung zu erlangen. In diesem Sinne bilden die folgenden Untersuchungen einen Beitrag, in dem das Verhalten des Blutfettes unter dem Einfluß verschiedener Hormone untersucht wurde.

Es kam dabei die *Bang*sche Mikromethode[1]) zur Anwendung, und zwar wurde immer der Gesamtpetrolätherextrakt ohne weitere Differenzierung bestimmt, der Fette und Cholesterin gemeinsam enthält. Wenn im folgenden der Kürze halber einfach von Blutfett gesprochen wird, so ist damit immer der Gesamtpetrolätherextrakt, also Fett plus Cholesterin gemeint. Auf die Differenzierung von Fett und Cholesterin wurde verzichtet einerseits, weil die Größe der erhaltenen Ausschläge gewöhnlich nur gering war, andererseits, weil verschiedene Autoren, so namentlich *Bloor*[2]), gezeigt haben, daß Fett und Cholesterin sich gewöhnlich gleichsinnig ändern, wobei aber dem Fette in zeitlicher und quantitativer Beziehung der Vortritt zukommt.

In bezug auf Genauigkeit der Methode sei auf meine frühere Publikation[3]) verwiesen, in welcher die Fehlergröße dieser *Bang*schen Mikrolipoidbestimmung einer eingehenden fehlerrechnerischen Behand-

---

[1]) *I. Bang*, Mikromethoden zur Blutuntersuchung. München, Bergmann 1922.

[2]) *W. R. Bloor*, Journ. of biol. Chem. **49**, 201, 1921.

[3]) *A. Fleisch*, diese Zeitschr. **177**, 453, 1926.

lung unterzogen wurde mit dem Resultat, daß der mittlere Versuchsfehler nur $4 \cdot 10^{-6}$ g Fett (= etwa 5 Proz.) beträgt.

Als Versuchstiere wurden Kaninchen verwendet, denen das Blut in einer Menge von jeweils 100 mg aus der Ohrvene entnommen wurde.

Die spontanen Variationen des Blutfettgehalts.

Horiuchi[1]) gibt in seiner eingehenden Analyse des lipämischen Komplexes beim Kaninchen an, daß die Tages- und Wochenschwankungen nur gering seien. Meine Erfahrungen stimmen damit nicht ganz überein. Allerdings zeigt die Mehrzahl der Tiere Tagesschwankungen, die sich gewöhnlich nur innerhalb 5 bis 10 Proz. bewegen; gelegentlich, wenn auch selten, sieht man aber doch ohne jede äußere Beeinflussung innerhalb 1 bis 3 Stunden Erhöhungen und Senkungen des Blutfettspiegels, die bis zu 50 Proz. und darüber betragen können. In ähnlicher Weise halten sich beim größeren Teil der Tiere die Schwankungen im Verlauf einer Woche in relativ engen Grenzen (etwa 20 Proz.), während bei einigen Tieren die Wochenschwankungen sehr beträchtlich sein können. Entweder kommen isolierte Sprünge bis auf das Doppelte oder die Hälfte vor, oder der Blutfettspiegel schwankt in mehrtägigem Turnus stark auf und ab. Ein Beispiel dieser letzteren Art ist in Abb. 1 wiedergegeben. Es ist zu betonen, daß diese Schwankungen die Größe der Versuchsfehler um ein Vielfaches übertreffen.

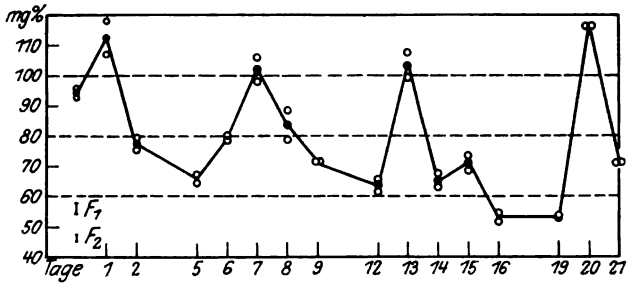


Abb. 1.

Spontane Schwankungen des Blutfettspiegels eines Kaninchens. Als Abszisse ist die Zeit in Tagen, als Ordinate der Blutfettgehalt in mg-Proz. aufgetragen. Die kleinen Kreise bedeuten Einzelanalysen, die schwarzen Punkte das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung. Die Strecke F_1 bedeutet die Größe des mittleren Versuchsfehlers der Einzelbestimmung und die Strecke F_2 den mittleren Versuchsfehler des arithmetischen Mittels.

Der Einfluß von Adrenalin auf den Blutfettspiegel.

Das Adrenalin wurde zum Teil intravenös und zum Teil in größeren Mengen subkutan verabreicht. Die Wirkung ist nicht einheitlicher Natur.

Bei der intravenösen Injektion wurden relativ *kleine Adrenalinmengen* zwischen 0,1 und 1 mg pro Tier gegeben. Dabei tritt in den ersten 40 Minuten nach der intravenösen Injektion kaum eine Veränderung des Blutfettes auf. Zwischen 40 Minuten und 3 Stunden hingegen sinkt der Blutfettspiegel in fünf von sechs Versuchen langsam ab, und diese Depression, die 17 bis 30 Proz. beträgt, hält etwa 24 Stunden an, worauf der Blutfettgehalt

[1]) *Y. Horiuchi*, Journ. of biol. Chem. **44**, 345, 1920.

wiederum zum Ausgangsniveau ansteigt. Von jedem dieser fünf Versuche wurden für bestimmte Zeitabschnitte die Mittelwerte aus allen Fettbestimmungen gebildet. Diese Mittelwerte sowie das Totalmittel sämtlicher fünf Versuche sind in Tabelle I wiedergegeben. Im ganzen sind für diese fünf Versuche 135 Fettanalysen ausgeführt worden.

Tabelle I.

Durchschnittlicher Blutfettgehalt in 10^{-6} g pro 100 mg Blut nach intravenöser Adrenalininjektion. Mittelwerte für bestimmte Zeitabschnitte vor und nach der Injektion.

Nr.	Vor Injektion	Nach 1 bis 50 Min.	Nach 51 Min. bis 3 Stdn.	Nach 3 bis 24 Stdn.	Länger als 1 Tag
16	79,0	81,4	69,0	65,5	—
16 a	70,0	69,5	63,5	58,0	—
18	63,0	65,2	49,0	44,0	64,0
21	76,5	69,5	68,0	62,8	75,0
23	64,0	63,0	55,3	49,2	53,0
Totalmittel	70,5	69,7	60,9	55,9	64,0

Sowohl aus jedem einzelnen Versuch wie auch aus dem Totalmittel von Tabelle I ist die *Senkung des Blutfettgehalts*, die im Mittel 21 Proz. beträgt, klar ersichtlich. In einem sechsten Versuch hingegen war das Resultat bei intravenöser Injektion einer mittleren Adrenalinmenge (0,25 mg) ein gegensätzliches. Die ersten 50 Minuten nach der Injektion blieb der Blutfettgehalt konstant, dann aber setzte eine kontinuierliche Steigerung ein, die nach 24 Stunden das Doppelte der Ausgangswerte erreichte. Erst nach dem dritten Tage erfolgte eine sturzartige Rückkehr zum Ausgangsniveau, das während weiterer 6 Tage annähernd erhalten blieb. Ob es sich in diesem Falle um eine umgekehrte Adrenalinwirkung oder um eine zufällige Spontanschwankung handelt, ist unentschieden.

Das von *Alpern* und *Collazo*[1]) am Hunde gefundene Resultat, daß durch intravenöse Adrenalininjektion die Blutlipoide etwas vermindert werden, wird durch die obigen Versuche auch für das Kaninchen als die gebräuchliche Reaktionsform gefunden.

Ganz anders sind hingegen die Resultate, wenn *große* Adrenalinmengen, nämlich 3 bis 6 mg pro Kaninchen appliziert werden. Hierfür wurde die subkutane Injektion verwendet, da die intravenöse Injektion so großer Mengen meistens zum Exitus führt. Es wurden darüber sechs Versuche mit zusammen 280 Fettanalysen ausgeführt. Die Reaktion während der ersten Stunde nach der Injektion ist uncharakteristisch, manchmal Senkung, häufiger aber Steigerung des Blutfettgehalts. Im Verlauf der ersten 24 Stunden nach der Injektion tritt viermal Erhöhung, einmal Konstantbleiben und nur einmal Senkung auf. Das Auffälligste bei allen sechs Versuchen ist aber, daß im Verlauf des ersten, manchmal aber auch erst im Verlauf des zweiten Tages nach der Injektion ein *rascher und sehr intensiver Anstieg des Blutfetts* erfolgt, der gewöhnlich nach 24 Stunden in der Hauptsache wiederum vorbei ist. Dabei werden 170 bis 250 und mehr Milligrammprozent

[1]) *Alpern* und *Collazo*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **35**, 288, 1923.

Blutfett gefunden, Werte, wie ich sie am unbehandelten Kaninchen mit der *Bang*schen Methode nie gefunden habe. Abb. 2 ist ein Beispiel dieser Reaktionsform.

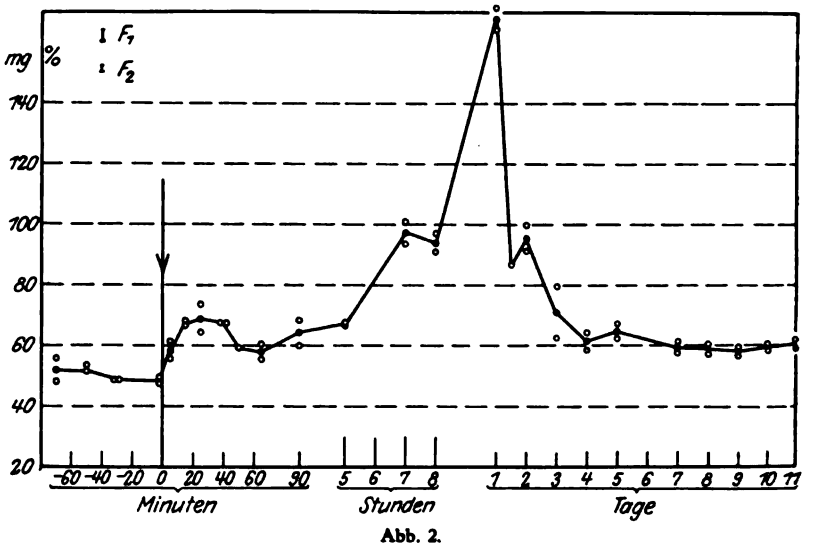


Abb. 2.

Fettgehalt des Kaninchenblutes (Ordinate) nach subkutaner Injektion (↓) von 3 mg Adrenalin. Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten, bzw. Stunden, bzw. Tagen an. Die kleinen Kreise bedeuten Einzelanalysen, die schwarzen Punkte das arithmetische Mittel einer Doppelbestimmung. Die senkrechte Linie F_1 stellt die Größe des mittleren Versuchsfehlers einer Einzelanalyse, die Linie F_2 den mittleren Versuchsfehler einer Doppelbestimmung dar.

Da eine ähnliche Zacke wie bei Abb. 2 bei allen sechs Versuchen aufgetreten ist, muß sie als mit der Adrenalininjektion in ursächlichem Zusammenhang stehend angenommen werden; dies um so mehr, als spontane Zacken am unbeeinflußten Kaninchen doch selten sind und nicht dieses Ausmaß erreichen.

Wir müssen somit das gegensätzliche Resultat feststellen, daß beim Kaninchen *kleine intravenös gegebene Adrenalinmengen Senkung, große, subkutan applizierte Adrenalindosen hingegen exzessive Steigerung des Blutfettgehalts erzeugen.*

Der Einfluß von Acetylcholin.

Das Acetylcholin wurde in sämtlichen Versuchen in einer einmaligen Injektion subkutan gegeben. Kleine Dosen bis zu 0,1 mg hatten keinen sicheren Effekt. Mengen zwischen 0,2 und 6 mg wurden in sieben Versuchen gegeben mit ziemlich einheitlicher Wirkung. ½ bis 1½ Stunden nach der Injektion beginnt der Blutfettgehalt zu sinken und bleibt während mindestens 1 bis 2 Tagen auf dem erniedrigten Niveau. In einigen Versuchen erfolgt der Wiederanstieg am dritten oder vierten Tage, in der Hälfte der Versuche aber erst nach dem sechsten Tage.

Um die zufälligen Spontanschwankungen des einzelnen Versuchs auf nebensächliche Bedeutung zu reduzieren, wurden für die verschiedenen

Zeitabschnitte eines Versuchs die Mittelwerte berechnet und das Totalmittel aus sämtlichen sieben Versuchen gebildet (s. Abb. 3).

Die Mittelwertkurve von Abb. 3 zeigt in der ersten Stunde nach der Injektion einen leichten Anstieg, der darin begründet ist, daß bei den zwei Versuchen mit größter Acetylcholinmenge (3 und 6 mg) direkt im Anschluß an die Injektion eine Steigerung des Blutfetts auftrat. Dadurch wird die schwache Senkung der übrigen fünf Versuche gegen Ende der ersten Stunde überkompensiert. Die Mittelwertkurve erreicht das Minimum im Zeitabschnitt 2 bis 6 Stunden nach der Injektion, und dieses Minimum bleibt während 24 Stunden nach der Injektion erhalten. Dabei beträgt die Senkung der Mittelwertkurve 20 Proz. des Ausgangsniveaus. Im Zeitabschnitt 1 bis 3 Tage nach der Injektion beginnt der allmähliche Wiederanstieg, das Ausgangsniveau wird aber erst nach durchschnittlich einer Woche erreicht.

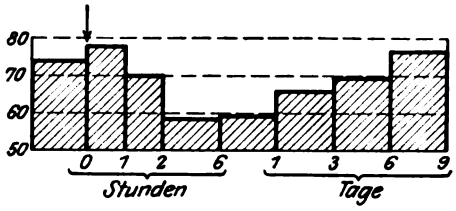


Abb. 3. Blutfettgehalt (Ordinate in mg-Proz.) in verschiedenen Zeitabschnitten nach Injektion von Acetylcholin (↓). Mittelwerte aus 7 Versuchen.

In vier weiteren Versuchen wurde eine sehr große Menge Acetylcholin, nämlich 15 mg subkutan gegeben. Das Resultat ist ein ganz anderes. Die für kleine Acetylcholinmengen charakteristische Senkung bleibt aus, und an deren Stelle tritt gewöhnlich im Verlauf des ersten Tages eine starke Erhöhung des Blutfettgehalts auf, die das 1½- bis 4fache des Ausgangswertes erreicht. Diese Erhöhung dauert etwa 24 Stunden, worauf die Kurve wieder steil zur Norm abfällt, um gelegentlich später nochmals eine starke Zacke nach oben zu machen. Abb. 4 gibt ein Beispiel dieser Reaktionsform.

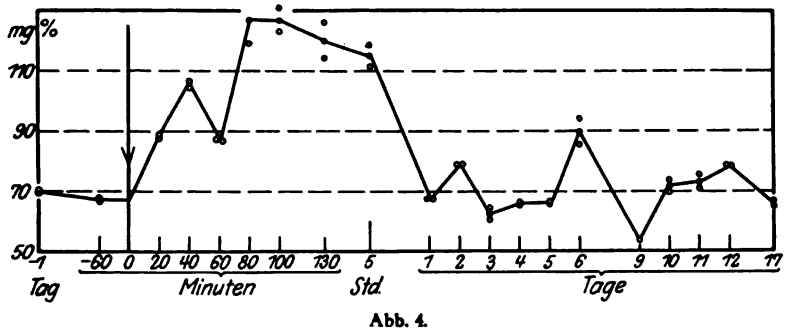


Abb. 4.

Fettgehalt des Kaninchenblutes nach subkutaner Injektion (↓) von 15 mg Acetylcholin. Übrige Legende wie bei Abb. 2.

Acetylcholin wirkt somit sonderbarerweise ganz ähnlich wie Adrenalin. *Kleine Dosen erzeugen Senkung, große Dosen hingegen Erhöhung des Blutfettgehalts.*

Die Wirkung von Leberextrakt auf den Blutfettgehalt.

Während wir heute schon einige grundlegende Kenntnisse über den Chemismus des Fettabbaues im Organismus besitzen, liegt die Regulierung

des Fettabbaues noch sehr im Dunkeln. Es existieren noch durchaus keine sicheren Anhaltspunkte, auf welchem Wege der Organismus die Mobilisierung von Fett und die Intensität des Abbaues dosiert und reguliert. Und doch kann vom theoretischen Gesichtspunkt aus kein Zweifel sein, daß die Intensität des Fettabbaues genau so reguliert ist, wie z. B. die Glykogenolyse durch Adrenalin und Insulin, oder wie irgend eine andere Funktion des Organismus. Es wurde schon wiederholt, so namentlich von *Geelmuyden*[1]) und *Fleisch*[2]), die Hypothese ausgesprochen, daß eventuell die Leber bei dieser Regulierung eine Rolle spielen könnte. Diese Vorstellung gründet sich darauf, daß das Fett das zweite Reservebrennmaterial darstellt, das dann mobilisiert und dissimiliert werden muß, wenn die Vorräte an Leberglykogen, dem ersten Reservebrennmaterial, absinken. Dementsprechend vertritt *Geelmuyden* den Standpunkt, daß die Glykogenarmut der Leber Fett mobilisieren und zur Leber wandern läßt, in der dann die Umwandlung des Fettes in Zucker vor sich geht. Allerdings findet *Geelmuyden* bei Lebern von verstorbenen Diabetikern keine einfache Beziehung zwischen Fettgehalt und Glykogengehalt der Leber; auf jeden Fall könne man nicht sagen, je mehr Glykogen desto weniger Fett.

Zweifellos erscheint die Hypothese, daß die Fettmobilisierung unter anderem auch von der Leber aus erfolgen könne, als durchaus plausibel. Es wurde deshalb untersucht, ob sich für diese Anschauung experimentelle Anhaltspunkte gewinnen lassen. Hierfür schien mir der Blutfettgehalt ein geeignetes Beobachtungsobjekt zu sein, indem irgend eine Beeinflussung der Fettmobilisierung voraussichtlich den Blutfettgehalt ändern dürfte. Da möglicherweise die Leber auf hormonalem Wege Einfluß auf die Fettmobilisierung besitzen könnte, so wurde die Wirkung von Leberextrakt auf den Blutfettgehalt untersucht.

Als Testtiere dienten Kaninchen. Die Lebern stammten von durch Nackenschlag getöteten Kaninchen und Meerschweinchen. Die frische Leber wurde zuerst mit Glassand etwa 10 Minuten lang zu einem feinen Brei zerrieben und dann mit der doppelten Menge Kochsalzlösung nochmals verrieben. Nach Abzentrifugieren und Filtrieren wurden von dem stark eiweißhaltigen Leberextrakt 10 ccm intravenös injiziert. Im Verlauf eines Versuchs wurden etwa 30 Blutproben am anderen, nicht für die Injektion verwendeten Ohr entnommen, um eine möglichst kontinuierliche Kurve des Blutfettgehalts zu erlangen.

Zehn solche Versuche mit ungekochtem Leberextrakt ergaben ein prinzipiell übereinstimmendes Resultat. In den ersten 5 bis 8 Minuten nach der Injektion ist der Fettgehalt leicht erniedrigt oder manchmal auch unverändert. Nach der achten Minute steigt der Blutfettgehalt regelmäßig deutlich an und erreicht gewöhnlich um die 20. Minute nach der Injektion den Höhepunkt. Diese Steigerung gegenüber dem Niveau vor der Injektion beträgt 10 bis 40 Proz. Sie ist aber nur von kurzer Dauer, indem das Blutfett 30 bis 50 Minuten nach der Injektion zuerst rasch und dann langsam abfällt. Der verlangsamte Abfall dauert gewöhnlich während des ganzen ersten Tages an und erniedrigt den Blutfettgehalt unter das Ausgangsniveau. Bei fünf Versuchen wurde das Blutfett während 1 bis 2 Wochen täglich weiter bestimmt, und da zeigte sich in zwei Versuchen, daß das Minimum erst am fünften Tage nach der Injektion erreicht wurde.

---

[1]) *H. Ch. Geelmuyden*, Acta, med. skand. **53**, 381, 1920.
[2]) *A. Fleisch*, Schweiz. med. Wochenschr. 1924, Nr. 49.

Um die systematischen, durch die Injektion bedingten Änderungen möglichst isoliert von zufälligen Spontanschwankungen beurteilen zu können, wurden für jeden Versuch die Mittelwerte für bestimmte Zeitabschnitte gebildet und darauf die Totalmittel sämtlicher zehn Versuche für die korrespondierenden Zeitabschnitte berechnet. Diese Totalmittelwerte sind in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

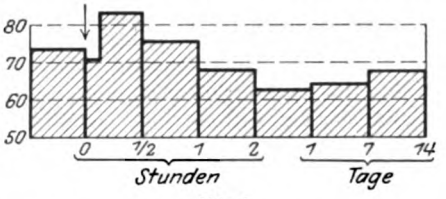


Abb. 5.

Blutfettgehalt von Kaninchen (Ordinate) nach Injektion von ungekochtem Leberextrakt. Mittelwerte aus zehn Versuchen. Die Ordinate des letzten Zeitabschnittes (7 bis 14 Tage) ist unsicher, da nur drei Versuche so lange ausgedehnt wurden.

Durch diese Bildung der Mittelwerte wird die Intensität der Ausschläge allerdings verkleinert, weil in einem bestimmten Zeitabschnitt, z. B. 8 bis 30 Minuten, die Kurve des Einzelversuchs entweder erst vom Normalwert zum Gipfel ansteigt, oder aber im anderen Versuch bereits wieder im Abfallen begriffen ist.

Da in den ersten 8 Minuten nach der Injektion der Blutfettgehalt leicht erniedrigt ist, so resultiert mit Sicherheit, daß die im Zeitabschnitt 8 bis 30 Minuten erscheinende Steigerung nicht etwa durch den Fettgehalt des injizierten Leberextrakts bedingt ist.

Wenn auch die *Steigerung im Zeitabschnitt 8 bis 30 Minuten* von im Mittel 13,4 Proz. gegenüber dem Niveau vor der Injektion nicht groß ist, so ist sie doch über allen Zweifel erhaben, indem sie regelmäßig in allen Versuchen auftrat. Das gleiche ist zu sagen von der *Senkung des Blutfettspiegels* um 14,6 Proz. unter das Ausgangsniveau im Zeitabschnitt 2 Stunden bis 1 Tag. Bei der Hälfte dieser zehn Versuche stammte die Leber von einem Tier, das während zweier Tage gehungert hatte. Es ließ sich aber kein deutlicher Unterschied in der Intensität und Art der Wirkung finden gegenüber Leberextrakten von gefütterten Tieren.

Da der verwendete Leberextrakt sehr eiweißhaltig ist, wurde untersucht, ob Eiweißung durch kurzes Kochen und nachherige Filtration die gefundenen Wirkungen vernichtet. Dies ist indes nicht der Fall. Es tritt bei kurzem Kochen nur eine Abschwächung der Wirksamkeit ein, aber die charakteristische Reaktion bleibt, wenn auch etwas abgeschwächt, erhalten. Langes Kochen hingegen scheint die Wirksamkeit zu vernichten.

Der Leberextrakt besitzt somit zweifellos eine Wirkung, und zwar eine biphasische, auf den Blutfettgehalt. Jedoch sind wir von der Möglichkeit einer Deutung der Befunde noch weit entfernt. Denn jede Veränderung des Blutfettgehalts kann verschiedene Ursachen haben. Abgesehen von einer Beeinflussung der Resorptionsgeschwindigkeit aus dem Darm kann z. B. die Erhöhung des Blutfettgehalts verursacht sein:

1. durch verstärkte Mobilisierung aus den Fettdepots, oder
2. durch verminderte Aufnahme in die Fettdepots oder in die Fett verarbeitenden und dissimilierenden Orte.

Desgleichen kann eine Senkung des Blutfettgehalts auftreten bei verminderter Fettmobilisierung, oder bei vermehrter Fettdeponierung, oder bei erhöhtem Fettverbrauch. Das Blutfett stellt eben, genau wie der Blutzucker, ein Durchgangsstadium dar, dessen Niveau ohne die Kenntnis anderer Faktoren keinen direkten Rückschluß gestattet über das Verhältnis und die Änderungen von Zu- und Abfluß. Die Verhältnisse liegen

hier ganz ähnlich wie bei einer Änderung des Blutdrucks, indem eine Blutdrucksenkung sowohl bei vermindertem Herzminutenvolumen als auch bei vermehrtem Abfluß nach der Peripherie resultiert.

Folgende Überlegung schien einen Schritt weiter zu helfen: Wenn eine Senkung des Blutfetts durch erhöhte Entnahme von Fett aus dem Blute bedingt ist, so wird voraussichtlich eine experimentelle Steigerung des Blutfettgehalts durch intravenöse Fetteinspritzung rascher verschwinden als unter normalen Verhältnissen. Dieses Phänomen dürfte aber fehlen, wenn die Senkung des Blutfettgehalts nur durch eine Bremsung der Fettmobilisierung bedingt ist. Dementsprechend wurde das Verhalten des Blutfetts nach intravenöser Fetteinspritzung untersucht, das erste Mal am normalen Tier und dann ein zweites Mal am gleichen Tiere, nachdem es einige Tage vorher Leberextrakt erhalten hatte.

Für die *intravenöse Fettinjektion* wurde zum Teil etwa 0,5 g Triolein, das mit etwas Natriumcarbonat und Kochsalzlösung fein emulgiert war, verwendet, zum Teil wurde Milch zentrifugiert und der Rahm mit Kochsalzlösung verdünnt injiziert. Bei diesen Versuchen wurde der Leberextrakt immer subkutan gegeben, weil er so viel besser ertragen wird als bei der immer etwas gefährlichen intravenösen Injektion. Die Änderungen des Blutfettgehalts durch den Leberextrakt sind bei der subkutanen Applikationsweise allerdings wesentlich schwächer als bei der intravenösen Injektion.

Im ganzen konnte an vier Kaninchen die Versuchsreihe vollständig durchgeführt werden. Das Resultat war in allen vier Versuchen einheitlicher Natur in dem Sinne, daß eine intravenöse Fettinjektion an einem mit Leberextrakt vorbehandelten Kaninchen zu einem kleineren und kürzer dauernden Anstieg des Blutfettes führt als die gleiche injizierte Fettmenge am normalen, d. h. nicht unter Leberextraktwirkung stehenden Tiere. Abb. 6 gibt ein Beispiel, das ungefähr der mittleren Reaktionsintensität sämtlicher vier Versuche entspricht.

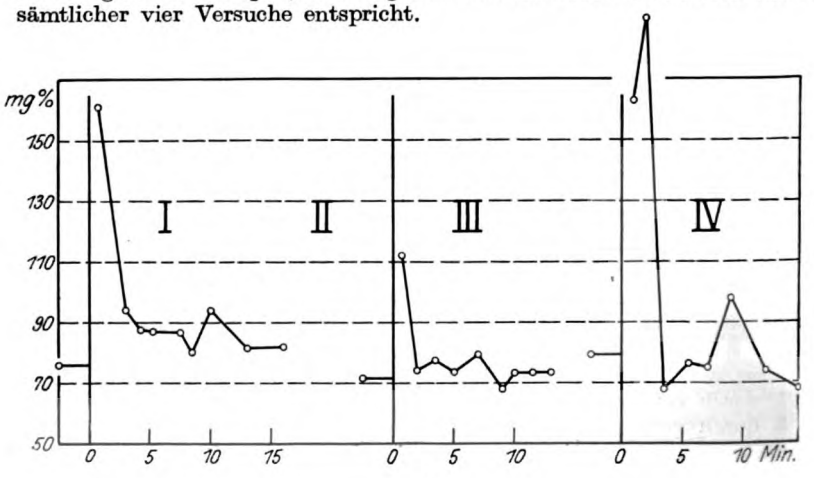


Abb. 6.

Blutfettgehalt eines Kaninchens (Ordinate) bei intravenöser Injektion von je 0,18 g Rahmfett. Beim senkrechten Strich von Abschnitt I wird 0,18 g Rahmfett injiziert. 4 Tage später bei II bekam das Kaninchen 10 ccm ungekochten Leberextrakt subkutan. Am 6. Tage nach der Injektion des Leberextraktes beim senkrechten Strich von III nochmals 0,18 g Rahmfett intravenös. 13 Tage nach Injektion des Leberextrakts bekommt das Kaninchen bei IV nochmals 0,18 g Rahmfett.

Auffällig ist einmal, wie außerordentlich rasch die injizierte Fettmenge wieder aus dem kreisenden Blute verschwindet, eine Beobachtung, die auch schon von *Bloor* gemacht worden ist. Spätestens nach 8 Minuten ist der Fettgehalt wieder annähernd auf das Ausgangsniveau gesunken.

Bei allen Fettinjektionen war die erste Blutentnahme (selbstverständlich aus der Vene des anderen Ohres) 0,8 Minuten nach der Injektion gemacht worden. Im Kurvenabschnitt III von Abb. 6, wo das Kaninchen unter der Wirkung des Leberextrakts steht, ist in diesem Zeitmoment der Fettgehalt wesentlich niedriger als in den Kurvenabschnitten I und IV, wo keine Wirkung von Leberextrakt vorhanden ist. Auch die Rückkehr zur Norm erfolgt bei III deutlich rascher als bei den Abschnitten I und IV.

In bezug auf die anderen drei Versuche ist folgendes zu referieren: Bei einem Versuch ist der Unterschied gleich stark wie bei dem Versuch von Abb. 6. Beim dritten Versuch ist der Unterschied sehr viel ausgesprochener, indem hier bei der Fettinjektion am unter Leberextraktwirkung stehenden Tiere überhaupt kein Anstieg des Blutfetts erfolgt, während die Fettinjektion in Abschnitt I und IV zu ungefähr demselben Anstieg wie in Abb. 6 führt. Beim vierten Versuch ist der Unterschied ebenfalls deutlich, aber etwas weniger stark als in Abb. 6.

Soweit aus nur vier Versuchen mit allerdings einheitlichem Resultat geschlossen werden kann, erscheint es somit als wahrscheinlich, daß die Injektion von Leberextrakt im Organismus Änderungen schafft im Sinne einer rascheren Ablagerung des Fettes. Die oben beschriebene Senkung des Blutfettspiegels während 1 bis 6 Tagen nach der Injektion von Leberextrakt scheint somit nicht durch eine verminderte Fettmobilisierung aus den Fettdepots, sondern durch größere Avidität der Zellen verursacht zu sein. Ob diese vergrößerte Avidität für Fett die Speicherungsorte oder aber die Stellen des Fettabbaues betrifft, kann auf Grund dieser Versuche nicht entschieden werden.

Wenn durch diese Versuche auch gewisse Anhaltspunkte dafür gewonnen wurden, daß die Leber eventuell in hormonaler Beziehung zum Mechanismus der Fettwanderung steht, so betrachte ich immerhin den Beweis für eine solche Anschauung als noch nicht erbracht.

Zusammenfassung.

Mit der *Bang*schen Mikromethode wird am Kaninchen der Blutfettgehalt, d. h. der Gesamtpetrolätherextrakt, der Fett plus Cholesterin enthält, untersucht.

Die spontanen Tages- und Wochenschwankungen beim Kaninchen liegen gewöhnlich innerhalb $\pm$ 20 Proz., sie können aber bei einzelnen Tieren ausnahmsweise auch sehr beträchtlich werden.

Intravenöse Injektionen von 0,1 bis 1 mg Adrenalin erzeugen meistens während 24 Stunden eine Senkung des Blutfettgehalts um 17 bis 30 Proz. Große Adrenalinmengen von 3 bis 6 mg subkutan appliziert, verursachen im Verlauf des ersten oder zweiten Tages einen intensiven Anstieg des Blutfettes auf das 2- bis 4fache, der gewöhnlich nach 24 Stunden wieder vorbei ist.

Kleine Dosen Acetylcholin (0,2 bis 6 mg) erzeugen während einigen Tagen eine Depression des Blutfettgehalts um durchschnittlich 20 Proz.

Größere Mengen Acetylcholin (15 mg) erzeugen während 24 Stunden eine Erhöhung des Blutfettspiegels auf das 1½- bis 4fache des Ausgangswertes.

Auf theoretischen Gesichtspunkten basierend, erscheint eine von der Leber ausgehende hormonale Beeinflussung der Fettmobilisierung und des Fettabbaues plausibel, weshalb der Einfluß von Leberextrakt auf den Blutfettspiegel untersucht wird. Sowohl frischer als auch kurz gekochter Leberextrakt beeinflußt effektiv den Blutfettgehalt im Sinne einer initialen Steigerung mit konsekutiver, tagelanger Depression. Da während der depressiven Wirkung des Leberextraktes eine intravenöse Fettinjektion zu einem wesentlich geringeren und kürzer dauernden Anstieg der Blutfettkurve führt als am normalen Tiere, so erscheint als wahrscheinliche Deutung, daß der Leberextrakt zu einer vergrößerten Fettavidität der Zellen führt.

Über die Wirkung des Kohlenoxyds auf den Stoffwechsel der Hefe.

Von

Otto Warburg (Berlin-Dahlem).

(Eingegangen am 24. August 1926.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Da Kohlenoxyd bei niedriger Temperatur mit Schwermetallverbindungen reagiert, z. B.:

$$CO + \text{Hämoglobin} = CO\text{-Hämoglobin},$$
$$CuCl + 2\,H_2O + CO = CuCl\,2\,H_2OCO^{1}),$$
$$Na_3[Fe(CN)_5NH_3] + CO = Na_3[Fe(CN)_5CO] + NH_3^{2}),$$

so lag es nahe, zu untersuchen, ob Kohlenoxyd die Zellatmung hemmt.

Als Versuchsmaterial benutzte ich Bäckerhefe, suspendiert in glukosehaltiger, saurer Phosphatlösung (m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose). Das Kohlenoxyd entwickelte ich durch Eintropfen von Ameisensäure in erwärmte konzentrierte Schwefelsäure und reinigte es durch Waschen mit starker Kalilauge. Es wurde in einem graduierten Quecksilbergasometer aufgefangen und hier mit Sauerstoff oder mit Sauerstoff und Stickstoff gemischt. Die genaue Zusammensetzung des Gasgemischs bestimmte ich gasanalytisch nach *Haldane*.

Ich teile die Versuche in folgenden Abschnitten mit:

I. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Atmung.
II. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung.
III. Gärung in Kohlenoxyd-Sauerstoffgemischen.
IV. Wirkung des Lichtes.
V. Einfluß der Wellenlänge des Lichtes.
VI. Zusammenfassung.
VII. Protokolle.

---

[1]) *W. Manchot*, Chem. Ber. **58**, 984.

[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **45**, 2869, 1912; *W. Manchot* und *Woringer*, ebendaselbst **46**, 3514, 1913.

I. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Atmung.

Zur Messung der Atmung benutzte ich Gefäße nach Abb. 1. Der Rauminhalt betrug etwa 15 ccm. In den Hauptraum H füllte ich 2 ccm einer Hefesuspension, die einige Milligramm Hefe enthielt, in den Einsatz E und die Birne B 5proz. Kalilauge zur Absorption der Atmungs- und Gärungskohlensäure. Waren die Gefäße durch Schliff mit ihren Manometern verbunden, so wurden die Gasräume mit Gasmischungen verschiedener Zusammensetzung gefüllt. Dann wurde bei 20 oder 37,5° im Wasserthermostaten geschüttelt. In jedem Falle überzeugte ich mich durch Variation der Schüttelgeschwindigkeit, daß die Manometerausschläge unabhängig von der Schüttelgeschwindigkeit waren, eine notwendige und leicht auszuführende Kontrolle. Aus den Manometerausschlägen h wurde der verbrauchte Sauerstoff x_{O_2} nach der Gleichung

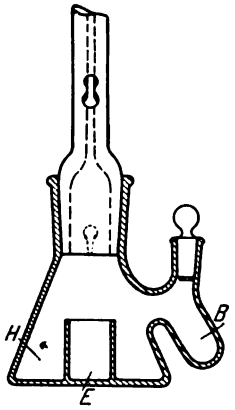


Abb. 1.

$$x_{O_2} = h K_{O_2}$$

berechnet, wo K_{O_2} die Gefäßkonstante für Sauerstoff bedeutet. Zur Orientierung über die Größe des Hefestoffwechsels diene die Angabe, daß 1 mg Hefe (Trockensubstanz) bei 20° und in glucosehaltiger Phosphatlösung unter Normalverhältnissen pro Stunde 50 bis 100 cmm Sauerstoff verbraucht und anaerob etwa das doppelte Volumen an Gärungskohlensäure entwickelt.

Der Gesamtdruck bei allen Versuchen war gleich dem Barometerstand. Je höher also der Kohlenoxyddruck, um so niedriger war der Sauerstoffdruck in den Kohlenoxyd-Sauerstoffgemischen, und zwar lag der Sauerstoffdruck zwischen 165 und 31 mm Hg. Innerhalb dieses Druckintervalls nimmt die Atmung der Hefe mit sinkendem Sauerstoffdruck ein wenig ab, um so mehr, wie es schien, je höher die Temperatur. Die Ursache dieser Abnahme zu ermitteln, wäre ein interessantes Thema. Für diese Arbeit bedeutete die Änderung der Atmung mit dem Sauerstoffdruck eine unerwünschte Komplikation. Sie wurde eliminiert, indem Kohlenoxydversuch und Kontrollversuch bei gleichen Sauerstoffdrucken ausgeführt wurden.

Die Versuchszeit betrug 30 bis 60 Minuten. Als Maß der Kohlenoxydwirkung diente die prozentische Atmungshemmung

$$\frac{A_0 - A}{A_0}$$

wo A_0 die Atmung ohne Kohlenoxyd und A die Atmung bei Gegenwart von Kohlenoxyd bedeutet.

Tabelle I enthält das Ergebnis der Messungen. Die Versuche 1 und 5 der Tabelle sind durch die Protokolle 1 und 2 (Abschnitt VII) ausführlich beschrieben. Tabelle I zeigt, daß Kohlenoxyd die Atmung der Hefe hemmt, und zwar, je nach der Zusammensetzung des Gasgemisches, in den angeführten Versuchen um 22 bis 77 Proz. Wichtig ist dabei, daß es nicht nur auf den Kohlenoxyddruck, sondern auch auf den Sauerstoffdruck ankommt. Beispielsweise betrug die Atmungshemmung bei einem Kohlenoxyddruck von 583 mm 24 oder 72 Proz., je nachdem der gleichzeitig herrschende Sauerstoffdruck hoch oder niedrig war. Wichtig ist ferner, daß die Hemmungen durch Kohlenoxyd vollständig reversibel sind (vgl. Protokoll 1). Mit Kohlenoxyd behandelte Hefe, in kohlenoxydfreies Gas zurückgebracht, atmete nicht schwächer, sondern eher ein wenig stärker als die Kontrollhefe.

Tabelle I.

Atmung der Hefe in Kohlenoxyd-Sauerstoffgemischen.

Nr.	Temperatur °C	Gasmischung in Vol.-Proz.		Gasdrucke in mm Hg		Hemmung der Atmung Proz.
		CO	O_2	CO	O_2	
1	20	80,1	19,9	590	146	35
		88,6	11,4	650	84	61
2	37,5	80,7	19,3	568	136	38
		87,7	12,3	615	87	60
3	37,5	78	22	550	155	22
		90,6	9,4	638	66	55
4	20	78,8	21,2	582	157	24
		79,0	4,4	585	32,5	72
5	37,5	76,8	23,2	540	164	34
		74,7	5,3	525	37,3	77
6	37,5	80	20	570	142	36
		80	4,4	570	31,3	74

Bezeichnen wir im folgenden den sauerstoffübertragenden Bestandteil des Atmungsferments kurz als „Atmungsferment", so folgt aus den mitgeteilten Versuchen, daß sich das Atmungsferment mit Kohlenoxyd verbindet und in dem Fermentmolekül diejenige Stelle besetzt, die normalerweise mit Sauerstoff reagiert. Hierdurch wird die sauerstoffübertragende Tätigkeit des Ferments gehemmt.

Ähnlich wie Hämoglobin reagiert also das Atmungsferment sowohl mit Kohlenoxyd als auch mit Sauerstoff. Abweichend von Hämoglobin bindet das Atmungsferment Sauerstoff fester als Kohlenoxyd. Deshalb kann man zwar aus Hämoglobin den Sauerstoff durch kleine Kohlenoxyddrucke austreiben, aber es bedarf relativ großer Kohlenoxyddrucke, um die Atmung durch Kohlenoxyd zu hemmen.

Für die Verteilung des Hämoglobins zwischen Kohlenoxyd und Sauerstoff gilt angenähert die Gleichung

$$\frac{HbO_2}{HbCO} \frac{p_{CO}}{p_{O_2}} \frac{\alpha_{CO}}{\alpha_{O_2}} = \text{konst.}$$

Analog könnte man daran denken, daß der Ausdruck

$$\frac{\alpha}{1-\alpha} \frac{p_{CO}}{p_{O_2}} \frac{\alpha_{CO}}{\alpha_{O_2}}$$

konstant sei, wo $a = \frac{A}{A_0}$ ist. Wie es scheint und man nach Tabelle I kontrollieren mag, ist dieser Ausdruck nicht konstant, sondern wird mit steigenden Kohlenoxyddrucken kleiner. Dies bedeutet, daß die Atmungshemmungen mit steigenden Kohlenoxyddrucken stärker zunehmen, als die Formel verlangt.

Die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Atmung der Hefe ist schwächer als die Wirkung der Blausäure. Blausäure hemmt die Atmung der gleichen Heferasse — in saurer, glucosehaltiger Phosphatlösung — fast vollständig bei einer Konzentration von 10^{-4} Mol./Liter, während die hier angewandten Kohlenoxydkonzentrationen, die nur unvollständig hemmen, von der Größenordnung 10^{-3} Mol./Liter sind.

Neben der Bäckerhefe habe ich auch Bierhefe als Versuchsmaterial benutzt, sowie einen aus Luft gezüchteten Kokkus („Mikrococcus candicans" des Berliner Hygienischen Instituts) und rote Blutzellen der Gans. Bierhefe und Kokkus verhielten sich gegen Kohlenoxyd wie Bäckerhefe. Dagegen wurde die Atmung der roten Vogelblutzellen nur wenig durch Kohlenoxyd gehemmt. Ich bemerke noch, daß Gewebsschnitte für Kohlenoxydversuche ungeeignet sind, weil man die Schnitte nicht so dünn herstellen kann, wie es der niedrige Sauerstoffdruck, bei dem man arbeiten muß, verlangt.

II. Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung.

Um die Wirkung des Kohlenoxyds auf die Gärung der Hefe zu untersuchen, verglich ich die Gärung in Stickstoff mit der Gärung in Kohlenoxyd. Hierbei bemühte ich mich, den Sauerstoffdruck so tief als möglich herabzudrücken, weil nach den oben mitgeteilten Erfahrungen an eine Konkurrenz zwischen Sauerstoff und Kohlenoxyd zu denken war. Als Absorptionsmittel für Sauerstoff benutzte ich gelben Phosphor. Der Einsatz *E* des Meßgefäßes (Abb. 1) enthielt statt Kalilauge Wasser, in das ein Stäbchen frisch geschmolzenen Phosphors zur Hälfte eintauchte. Die Gärungsmessungen begannen, nachdem die Gefäße 30 Minuten geschüttelt worden waren, so daß der Phosphor Zeit hatte, den Sauerstoff aus dem Gasraum zu absorbieren.

Es zeigte sich, daß Kohlenoxyd bei dem Druck von einer Atmosphäre die Gärung nicht hemmt. Die Gärungen in Kohlenoxyd und in Stickstoff waren gleich (vgl. Protokoll 3). Kohlenoxyd ist also eine Substanz, mit der man, ähnlich wie mit Blausäure oder Schwefelwasserstoff, die Atmung von der Gärung trennen kann.

III. Gärung in Kohlenoxyd-Sauerstoffgemischen.

Bei ausreichender Versorgung mit Sauerstoff ist die Atmung der Bäckerhefe (in Volumina O_2) etwa halb so groß, wie die anaerobe Gärung (in Volumina CO_2). Die Atmung würde also genügen, um die Gärung vollständig zu hemmen. Im allgemeinen geschieht das nicht, sondern es bleibt unter aeroben Bedingungen ein kleiner Teil der Gärung übrig, die „aerobe" Gärung.

Um Atmung und Gärung in kohlenoxydhaltigem Gas zu untersuchen, dienten Gefäßpaare[1]) nach Abb. 2. Tabelle II enthält das Ergebnis von drei Versuchsreihen. Die Gärung steigt, wenn die Atmung sinkt. Doch reicht die Atmungshemmung nicht aus, um den Anstieg der Gärung zu erklären, vielmehr kommt eine Wirkung des Kohlenoxyds auf die *Pasteur*sche Reaktion[2]) hinzu. Trotz unvollkommen gehemmter Atmung findet man bei höheren Kohlenoxyddrucken fast den anaeroben Gärungswert.

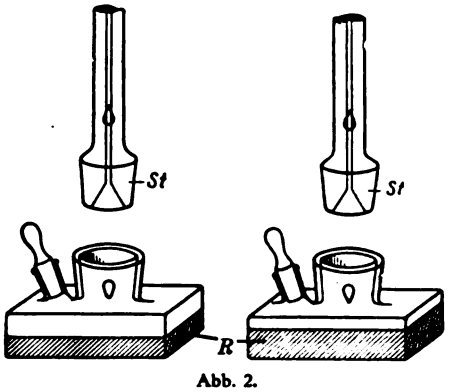


Abb. 2.

Zur Methodik.

1. Bei Stoffwechselmessungen nach dem Prinzip der Abb. 2 arbeitet man mit gleichen Hefe*mengen* oder mit gleichen Hefe*konzentrationen*. Korrekter ist die zweite Anordnung, da bei ihr etwaige Beeinflussungen des Stoffwechsels durch Endprodukte des Stoffwechsels keine Fehler bedingen. 2. Eine Fehlerquelle bei Hefeversuchen besteht darin, daß man die Löslichkeit der Kohlensäure in starken Phosphatlösungen — die nicht bekannt ist — falsch schätzt und so mit falschen Gefäßkonstanten rechnet. Man tut deshalb gut, mit möglichst verdünnten Phosphatlösungen zu arbeiten.

Beide Punkte sind bei den bisherigen[3]) Anwendungen der Methode auf den Hefestoffwechsel nicht genügend berücksichtigt worden. Zu empfehlen

---

[1]) Vgl. *O. Warburg*, diese Zeitschr. **152**, 51, 1924; Formeln in Protokoll 4.

[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **172**, 432, 1926.

[3]) *O. Meyerhof*, diese Zeitschr. **162**, 43, 1925; *E. Negelein*, ebendaselbst **165**, 203, 1925.

ist eine Kontrolle, in der man die anaerobe Gärung in zwei Gefäßen, die verschiedene Flüssigkeitsmengen enthalten, mißt. Beide Gefäße müssen die gleiche Gärung pro Milligramm Hefe ergeben.

Tabelle II.

Atmung und Gärung der Hefe in Kohlenoxyd-Sauerstoff.

Nr.	Versuchszeit	Gasmischungen in Vol.-Proz.	Atmung (x_{O_2}) cmm	Gärung (x_G) cmm	Hemmung d. Atmung Proz.	Steigerung der Gärung Proz.	Meyerhof-Quotient
1 (Protokoll 4)	40′	79 N_2, 21 O_2	— 76	+ 33			1,56
		80 CO, 20 O_2	— 58	+ 80	24	140	1,19
		Luft, 10^{-3} n. HCN	—	+ 151			
2 (Protokoll 5)	20′	95 N_2, 5 O_2	— 21,6	+ 15,4			1,98
		75 CO, 5 O_2	— 7,3	+ 54,2	66	250	0,65
		Luft, 10^{-3} n. HCN	—	+ 58,0			
3	30′	79 N_2, 21 O_2	— 51	+ 30,5			1,48
		80 CO, 20 O_2	— 38,8	+ 61	24	100	1,16
		95 CO, 5 O_2	— 10,4	+ 98	80	220	0,77
		Luft, 10^{-3} n. HCN	—	+ 106			

IV. Wirkung des Lichts.

Bei einem Besuch in Dahlem erzählte mir *A. V. Hill* von Arbeiten aus dem Cambridger physiologischen Institut, nach denen die Affinität zwischen Kohlenoxyd und Hämoglobin abnimmt, wenn man belichtet. Auch andere Kohlenoxyd-Eisenverbindungen dissoziieren, wie ich beim Studium der Literatur fand, im Licht. Die erste Arbeit über die Lichtempfindlichkeit von Kohlenoxyd-Eisenverbindungen ist von *Haldane* und *Smith*[1]). Sie betrifft das Kohlenoxyd-Hämoglobin und stammt aus dem Jahre 1896. Später (1907) teilten *Dewar*[2]) und *Jones* mit, daß Eisencarbonyl bei Belichtung Kohlenoxyd abspaltet, wobei sich die Reaktion abspielt

$$2\,Fe(CO)_5 = Fe_2(CO)_9 + CO.$$

Im Gegensatz zu Eisencarbonyl ist Nickelcarbonyl nach *Dewar* nicht lichtempfindlich. *Manchot*[3]) erwähnt 1912, daß die Verbindung

$$Na_3[Fe(CN)_5CO]$$

im Sonnenlicht Kohlenoxyd entwickelt.

Auf Grund der zitierten Arbeiten legte ich mir die Frage vor, ob nicht auch die Verbindung zwischen Atmungsferment und Kohlenoxyd bei Belichtung dissoziiere. Dann müßte die Atmungshemmung

[1]) *J. Haldane* und *Smith*, Journ. Physiol. **20**, 497, 1896.
[2]) *J. Dewar* und *Jones*, Proc. Roy. Soc. (A) **76**, 558, 1905; **79**, 66, 1907.
[3]) *W. Manchot*, Chem. Ber. **45**, 2869, 1912.

bei Belichtung kleiner werden. Das ist nun in der Tat der Fall, und zwar in einem solchen Maße, daß bei Belichtung die Atmungshemmung zum größeren Teil verschwindet. Indem man den Atmungstrog abwechselnd mit einer elektrischen Lampe belichtet und wieder verdunkelt, kann man beliebig oft Atmung entstehen und verschwinden lassen.

Tabelle III.

20°. Pro Gefäß 8 mg Bäckerhefe und 2 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose.

	95 Proz. N_2. 5 Proz. O_2 (A_0) cmm O_2	95 Proz. CO. 5 Proz. O_2 (A) cmm O_2	$\frac{A_0-A}{A_0}$ Proz.
10′ dunkel	17,4	5,7	69
10′ „	15,4	4,5	
10′ hell	16,2	*14,6*	14
10′ „	16,0	*13,2*	
10′ dunkel	17,0	5,0	71
10′ „	16,0	4,5	
10′ hell	14,0	*12,5*	14
10′ „	15,0	*12,5*	
10′ dunkel	16,0	5,0	71
10′ „	15,0	4,0	
usw.			

Tabelle III enthält ein Versuchsbeispiel. Zur Belichtung diente eine ½-Watt-Metallfadenlampe von 75 Watt Stromverbrauch, deren leuchtender Faden etwa 4 cm von dem Boden des Atmungstrogs entfernt war. Die Atmungshemmung im Dunkeln betrug rund 70 Proz. und sank bei Belichtung auf 14 Proz.

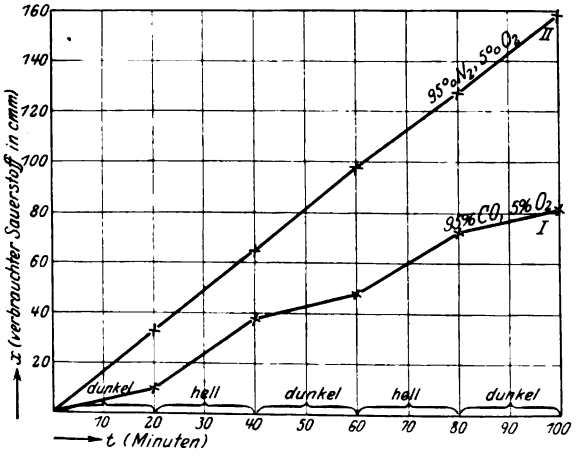


Abb. 3.

Abb. 3 ist eine graphische Darstellung desselben Versuchs. Die Neigung der Atmungskurve in Stickstoff-Sauerstoff ist nahezu unabhängig von der Belichtung. Die Atmungskurve in Kohlenoxyd erleidet jedesmal bei Belichtung und Verdunkelung einen Knick, sie wird steiler bei Belichtung und flacher bei Verdunkelung.

Mißt man nicht die Atmung, sondern die Gärung in Kohlenoxyd, so hat man gleichfalls beim Belichten und Verdunkeln einen Knick der Kurve, jedoch in umgekehrter Richtung wie bei den Atmungsversuchen. Hier ist die Kurve im Hellen flacher als im Dunkeln, weil bei Belichtung die Gärung abnimmt. Man vergleiche die Abb. 4, aus der außerdem hervorgeht, daß in kohlenoxyd*freiem* Gas weder die anaerobe noch die aerobe Gärung durch Belichtung merklich beeinflußt wird.

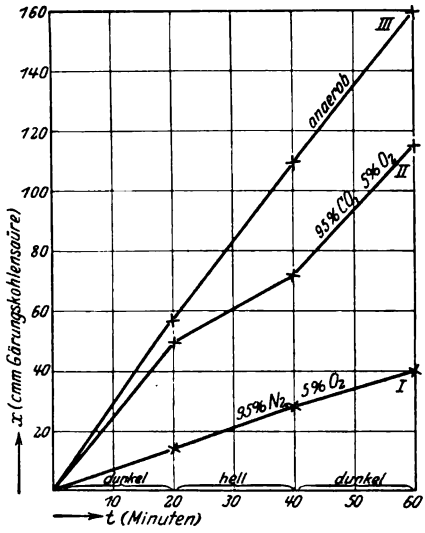


Abb. 4.

V. Einfluß der Wellenlänge des Lichts.

Um die im vorigen Abschnitt geschilderten Erscheinungen näher zu untersuchen, isolierte ich folgende Spektralbezirke[1]):

Blau	436 $\mu\mu$	aus der Strahlung der Quecksilberdampflampe.
Grün	546 $\mu\mu$	
Gelb	578 $\mu\mu$	
Rot	700 bis 750 $\mu\mu$	aus der Strahlung einer Metallfadenlampe.

[1]) Vgl. bezüglich der in diesem Abschnitt befolgten Methoden, Zeitschr. f. physik. Chem. **106**, 191, 1923.

Wegen der außerordentlich schwachen Absorption dieser Wellenlängen durch Hefe war es nicht möglich, die Absorption des Lichtes zu messen und sie mit der photochemischen Wirkung zu vergleichen. Immerhin aber konnte festgestellt werden, welche der genannten Spektralbezirke photochemisch wirken, und ferner, wie sich die Größen der photochemischen Wirkungen verhalten, wenn man Hefezellen in verschiedenfarbiges Licht gleicher Intensität bringt.

Die Messung der Strahlungsintensität geschah bolometrisch nach *E. Warburg*. Die Intensitäten wurden so ausgeglichen, daß sie in allen Spektralbezirken rund $7 \cdot 10^{-5}$ cal/qcm . sec betrugen. Da die dünnen Hefesuspensionen nur einen kleinen Bruchteil der eingestrahlten Energie absorbierten, so befanden sich alle Hefezellen im Versuchsgefäß unter der Wirkung der an der Eintrittsstelle gemessenen Lichtintensität. Im Vergleich zu der Intensität der Sonnenstrahlung auf der Erdoberfläche ($\sim 10^{-2}$ cal/qcm . sec) war diese Intensität klein.

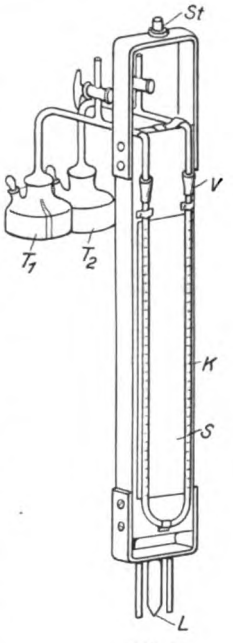


Abb. 5.

Zur Messung der photochemischen Wirkung standen zwei Wege offen: Messung der Atmungs*zu*nahme oder der Gärungs*ab*nahme. Ich wählte den zweiten Weg, bestimmte also in Kohlenoxyd-Sauerstoff die Abnahme der Gärung unter dem Einfluß der Bestrahlung. In den Versuchstrog des Differentialmanometers (Abb. 5) füllte ich 5 ccm Hefesuspension ein (20 mg Bäckerhefe, Frischgewicht, in m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose), in den Kontrolltrog die gleiche Menge der gleichen aber hefe*freien* Lösung.

Der Rauminhalt der Gefäße war groß gegen das Volumen der eingefüllten Flüssigkeit (v_G 48,5 ccm, v_F 5 ccm), so daß die Gefäßkonstanten für Sauerstoff (K_{O_2}) und für Kohlensäure (K_{CO_2}) nahezu gleich waren. Die Atmung machte sich also manometrisch kaum[1]) geltend und die Gärungskohlensäure x_G war nahezu proportional dem entwickelten Druck H

$$x_G = H K_{CO_2}.$$

[1]) Denn es ist der durch die Atmung erzeugte Druck gleich $-\frac{x_{O_2}}{K_{O_2}} + \frac{x_{O_2}}{K_{CO_2}}$, falls der respiratorische Quotient 1 ist. Vgl. dazu *O. Warburg*, diese Zeitschr. **172**, 440, 1926.

Tabelle IV.

95 Proz. CO, 5 Proz. O_2.

20°. 20 mg Bäckerhefe (Frischgewicht) in 5 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose Gasraum 48,5 ccm.

Wellenlänge	Intensität cal / qcm × Sekunden	Zeit	Druckänderung in mm Capronsäure	Photochemische Wirkung
—	—	5′ dunkel	+ 11,1 ×	
436 μμ (blau)	$7{,}2 \times 10^{-5}$	5′ hell	+ 5,5	11,6—4,3 = *7,3 mm*
		5′ „	+ 4,3 ×	
		5′ „	+ 4,2	
—	—	5′ dunkel	+ 10,0	
		5′ „	+ 12,1 ×	
546 μμ (grün)	$7{,}4 \times 10^{-5}$	5′ hell	+ 10,1	11,9—9,4 = *2,5 mm*
		5′ „	+ 9,4 ×	
—	—	5′ dunkel	+ 11,1	
		5′ „	+ 11,7 ×	
578 μμ (gelb)	$7{,}7 \times 10^{-5}$	5′ hell	+ 9,2	11,3—8,5 = *2,8 mm*
		5′ „	+ 8,5 ×	
—	—	5′ dunkel	+ 10,6	
		5′ „	+ 10,9 ×	

Tabelle V.

95 Proz. CO, 5 Proz. O_2.

20°. 20 mg Bäckerhefe in 5 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose. Gasraum 48,5 ccm.

Wellenlänge	Intensität cal / qcm × Sekunden	Zeit	Druckänderung in mm Capronsäure	Photochemische Wirkung
—	—	5′ dunkel	+ 12,6 ×	
700—750 μμ (rot)	$7{,}4 \times 10^{-5}$	5′ hell	+ 12,7	keine
		5′ „	+ 12,8 ×	
—	—	5′ dunkel	+ 13,0	
		5′ „	+ 12,6 ×	
		5′ „	+ 12,6	
436 μμ (blau)	$5{,}4 \times 10^{-5}$	5′ hell	+ 6,7	12,2—5,4 = *6,8*
		5′ „	+ 5,4 ×	
—	—	5′ dunkel	+ 10,6	
		5′ „	+ 11,8 ×	

Die Sperrflüssigkeit des Differentialmanometers war Capronsäure. Die Druckänderungen wurden von 5 zu 5 Minuten mit einem Katethometermikroskop abgelesen. Es schien, als ob die Wirkung der Bestrahlung und Verdunkelung immer erst nach einer gewissen Induktionszeit einsetzte, von der ich nicht sagen kann, ob sie durch innere oder äußere Ursachen bedingt war. Wie dem auch sei, bei der Berechnung ließ ich die ersten 5 Minuten nach Verdunkelung oder Bestrahlung heraus und berechnete die photochemische Wirkung aus den folgenden, in den Tabellen mit einem Kreuz versehenen Perioden. Jeder Bestrahlungsversuch war von zwei Dunkelversuchen eingerahmt, deren Mittel die „Dunkelgärung" ergab.

Die Tabellen IV und V enthalten je eine Versuchsreihe. Im langwelligen Rot, zwischen 700 und 750 $\mu\mu$, war eine photochemische Wirkung nicht nachweisbar. Im Gelb, Grün und Blau war eine Wirkung vorhanden, und zwar im Blau eine 2½- bis 3mal größere als im Gelb und im Grün.

Die Versuche beweisen, daß das Atmungsferment — in seiner Verbindung mit Kohlenoxyd — Blau, Grün und Gelb absorbiert, daß also die Atmungsferment-Kohlenoxydverbindung ein Farbstoff ist. Nehmen wir an, daß die spezifischen photochemischen Wirkungen nicht verschiedener sind als nach der Quantentheorie zu erwarten, so folgt weiterhin aus den Versuchen der Tabellen IV und V, daß der Farbstoff im Blau stärker absorbiert als im Grün und im Gelb.

Neben der relativen photochemischen Wirkung ist ihre absolute Größe von Interesse. Multiplizieren wir die Lichtintensität, die an der Eintrittsstelle in den Gärungstrog herrscht, mit der bestrahlten Fläche (17 qcm) und der Versuchszeit (300 Sekunden), so erhalten wir die gesamte in der Versuchszeit in den Trog eingestrahlte Energie in Kalorien. Multiplizieren wir ferner die manometrischen Lichtwirkungen mit der Gefäßkonstante für Kohlensäure (K_{CO_2}), so erhalten wir die durch Bestrahlung bewirkte Gärungshemmung in Kubikmillimetern Gärungskohlensäure. Dividieren wir die Kubikmillimeter CO_2 durch die eingestrahlten Kalorien, so erhalten wir die Gärungshemmung pro Kalorie eingestrahlter Lichtenergie.

Tabelle VI enthält das Ergebnis dieser Rechnung, die für Blau eine Gärungshemmung von 89 cmm Kohlensäure pro Kalorie eingestrahlten Lichtes ergibt. Wäre die eingestrahlte Energie von den Hefezellen vollständig absorbiert worden, so hätte, wie man leicht berechnen kann, jedes absorbierte Lichtquantum ¼ Molekül Gärungskohlensäure

zum Verschwinden gebracht (oder am Entstehen verhindert). Da jedoch die Hefesuspension nur einen sehr kleinen Teil der eingestrahlten Energie absorbierte, so folgt, daß jedes absorbierte Quantum des blauen Lichtes sehr viele Moleküle Gärungskohlensäure zum Verschwinden bringt (oder am Entstehen verhindert). Wir haben also hier keine einfache Beziehung zwischen absorbierten Quanten und Stoffumsatz. Eine solche ist auch nicht zu erwarten, da das Licht auf den Stoffumsatz wirkt, indem es ein inaktiviertes Ferment reaktiviert.

Tabelle VI.

$K_{CO_2} = 4.53$ (qmm).

Wellenlänge $\mu\mu$	In 5′ in den Gärungstrog eingestrahlte Energie cal.	In 5′ beobachtete Lichtwirkung mm	Gärungshemmung in 5′ cmm CO_2	$\frac{\text{cmm } CO_2}{\text{cal}}$
436	0,37	7,3	33	*89*
546	0,378	2,5	11,4	*30*
578	0,394	2,8	12,7	*32*
700—750	0,38	0	0	*0*

VI. Ergebnisse.

1. Das Atmungsferment der Hefe verbindet sich mit Kohlenoxyd.

2. Bei Gegenwart von Kohlenoxyd und Sauerstoff verteilt sich das Atmungsferment zwischen beiden Gasen. Deshalb hemmt ein bestimmter Kohlenoxyddruck die Atmung um so stärker, je niedriger der Sauerstoffdruck ist.

3. Die Verbindung des Atmungsferments mit Kohlenoxyd dissoziiert bei Belichtung, wie andere Kohlenoxyd-Eisenverbindungen.

4. Das Atmungsferment in seiner Verbindung mit Kohlenoxyd ist ein Farbstoff. Es absorbiert die Wellenlängen 436, 546 und 578 $\mu\mu$, und zwar wahrscheinlich 436 $\mu\mu$ stärker als 546 und 578 $\mu\mu$.

5. Da die Kohlenoxyd-Metallverbindungen Molekülverbindungen sind, so ist anzunehmen, daß auch die Bindung des Sauerstoffs an das Metall des Atmungsferments primär durch Nebenvalenzen erfolgt. Ob sich dann weiterhin bei der Tätigkeit des Atmungsferments die Hauptvalenz des Metalls ändert oder nicht, bleibt zunächst unentschieden.

VII. Protokolle.

Protokoll 1.

Der Versuch zeigt, daß die Atmung der Hefe durch CO gehemmt wird und daß die Hemmungen reversibel sind. 20°. Je 8 mg Bäckerhefe (Frischgewicht) : 2 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose. Im Einsatz KOH.

Volumina in ccm . . .	v_F 2,4 v_G 15,5	v_F 2,4 v_G 14,3	v_F 2,4 v_G 13,7	v_F 2,4 v_G 13,5
Gefäßkonstanten in qmm	k_{O_2} 1,45	k_{O_2} 1,34	k_{O_2} 1,29	k_{O_2} 1,27
Gasmisch. in Vol.-Proz.	79,1 N_2	80,1 CO	89,9 N_2	88,6 CO
(Gesamtdr. 751 mm Hg)	20,9 O_2	19,9 O_2	10,1 O_2	11,4 O_2
Sauerstoffverbrauch	mm cmm	mm cmm	mm cmm	mm cmm
nach 30′	— 40,5 *58,8*	— 29,5 *39,5*	— 44,5 *57,2*	— 18,5 *23,5*
„ 60′	— 80,5 *117*	— 57,0 *76,5*	— 90,5 *116*	— 36,0 *45,7*
	↓	↓	↓	↓
Gasmisch. in Vol.-Proz.	79,1 N_2	79,1 N_2	89,9 N_2	89,9 N_2
	20,9 O_2	20,9 O_2	10,1 O_2	10,1 O_2
Sauerstoffverbrauch	mm cmm	mm cmm	mm cmm	mm cmm
nach 30′	— 37,5 *54*	— 42 *56*	— 45 *58*	— 45 *57*

Daraus folgt:

Hemmung der Atmung durch 80,1 Proz. CO, 19,9 Proz. O_2:

$$\frac{117-76{,}5}{117} = 34{,}6 \text{ Proz.}$$

Hemmung der Atmung durch 88,6 Proz. CO, 11,4 Proz. O_2:

$$\frac{116-45{,}7}{116} = 60{,}5 \text{ Proz.}$$

Nach Entfernung des Kohlenoxyds war die Hemmung der Atmung verschwunden, wie die letzte Horizontalspalte zeigt.

Protokoll 2.

Der Versuch zeigt, daß — bei ungefähr gleichen CO-Drucken — die Atmungshemmung um so größer ist, je niedriger der Sauerstoffdruck. 37,5°. Je 4 mg Bäckerhefe (Frischgewicht) in 2 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose. Im Einsatz KOH.

Volumina in ccm . . .	v_F 2,4 v_G 15,5	v_F 2,4 v_G 14,3	v_F 2,4 v_G 13,7	v_F 2,4 v_G 13,5
Gefäßkonstant. in qmm	k_{O_2} 1,38	k_{O_2} 1,27	k_{O_2} 1,22	k_{O_2} 1,20
Gasmisch. in Vol.-Proz.	79,1 N_2	76,8 CO	95,7 N_2	74,7 CO
(Barometerst. 751 mm Hg)	20,9 O_2	23,2 O_2	4,3 O_2	5,3 O_2· 20,0 N_2
Sauerstoffverbrauch	mm cmm	mm cmm	mm cmm	mm cmm
nach 20′	— 37 *51*	— 27,5 *34,9*	— 36 *44*	— 10 *12,0*
nach 40′	— 72 *99,5*	— 51,5 *65,2*	— 70 *85,2*	— 16,5 *19,8*

Daraus folgt:

Hemmung der Atmung durch 76,8 Proz. CO, 23,2 Proz. O_2:

$$\frac{99{,}5-65{,}2}{99{,}5} = 34 \text{ Proz.}$$

Hemmung der Atmung durch 74,7 Proz. CO, 5,3 Proz. O_2:

$$\frac{85{,}2-19{,}8}{85{,}2} = 77 \text{ Proz.}$$

Protokoll 3.

Der Versuch zeigt, daß CO — selbst bei den niedrigsten O_2-Drucken, die man erreichen kann — die Gärung der Hefe nicht hemmt. 20°. Je 7 mg Bäckerhefe in 2 ccm m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose. Im Einsatz gelber Phosphor.

Volumina in ccm . . . . . Gefäßkonstanten in qmm	v_F 2,3 v_G 13,8 k_{CO_2} 1,48		v_F 2,3 v_G 14,4 k_{CO_2} 1,54	
Gasraum	100 Vol.-Proz. N_2		100 Vol.-Proz. CO	
Nachdem 30′ lang mit Phosphor zur Entfernung von O_2 geschüttelt worden war, begann die Gärungsmessung	mm	cmm	mm	cmm
	+ 64	95	+ 61	94

Die Gärungen in Stickstoff und in Kohlenoxyd waren also — innerhalb der Grenzen der Meßfehler — gleich.

Protokoll 4.

Atmung und Gärung der Hefe in Kohlenoxyd-Sauerstoff.

Formeln.

$$(O_2 \text{ in cmm}): x_{O_2} = \frac{H K_{CO_2} - h k_{CO_2}}{\frac{K_{CO_2}}{K_{O_2}} - \frac{k_{CO_2}}{k_{O_2}}}$$

$$(\text{Atmungs- + Gärungs-}CO_2 \text{ in cmm}): x_S = \frac{H K_{O_2} - h k_{O_2}}{\frac{K_{O_2}}{K_{CO_2}} - \frac{k_{O_2}}{k_{CO_2}}}$$

$$(\text{Gärungs-}CO_2 \text{ aerob}): x_G = x_S + x_{O_2}$$

$$(\text{Gärungs-}CO_2, \text{ anaerob}): x_G = h k_{CO_2}$$

wo sämtliche x-Werte auf gleiche Zeiten zu beziehen sind.

Versuch.

Der Versuch zeigt, daß in Kohlenoxyd-Sauerstoff die Atmung der Hefe abnimmt, die Gärung der Hefe zunimmt. 20°. Pro Gefäß 7 mg Bäckerhefe (Frischgewicht) in m/20 KH_2PO_4. m/18 Glucose. $a_{O_2} = 0{,}03$. $a_{CO_2} = 0{,}87$.

Gasmischungen in Vol.-Proz.	79 N_2, 21 O_2		80 CO, 20 O_2	
ccm	v_F 7 v_G 6,16	v_F 3 v_G 10,7	v_F 7 v_G 6,85	v_F 3 v_G 10,1
qmm	K_{O_2} 0,594 K_{CO_2} 1,18	k_{O_2} 1,01 k_{CO_2} 1,26	K_{O_2} 0,661 K_{CO_2} 1,25	k_{O_2} 0,949 k_{CO_2} 1,20
	H (mm)	h (mm)	H (mm)	h (mm)
20′	— 16	+ 6,5	+ 12	+ 27
40′	— 33,5	+ 12,5	+ 23	+ 54
	↓	↓		↓
	10^{-3} n. HCN	10^{-3} n. HCN		10^{-3} n. HCN
	H (mm)	h (mm)		h (mm)
20′	+ 64,5	+ 59,5		+ 62,0
	Es war also in 40′:		Es war also in 40′:	
	$x_{O_2} = -$ 76 cmm		$x_{O_2} = -$ 58 cmm	
	$x_S = +$ 109 „		$x_S = +$ 138 „	
	(aerob) $x_G = +$ 33 „		(aerob) $x_G = +$ 80 „	
	(anaerob) $x_G = +$ 151 „		(anaerob) $x_G = +$ 149 „	
	Meyerhof-Quotient 1,56		*Meyerhof*-Quotient 1,19	

Protokoll 5.

Atmung und Gärung der Hefe in Kohlenoxyd-Sauerstoff. Der Versuch zeigt, daß in Kohlenoxyd die Atmung abnimmt, die Gärung zunimmt. 20°. Pro Gefäß 7 mg Bäckerhefe (Frischgewicht) in m/20 KH_2PO_4, m/18 Glucose.

$\alpha_{O_2} = 0{,}03$. $\alpha_{CO_2} = 0{,}87$.

Gasmischungen in Vol.-Proz.	79 N_2, 21 O_2		95 N_2, 5 O_2		75 CO, 5 O_2, 20 N_2	
ccm	v_F 7 v_G 6,16	v_F 3 v_G 10,7	v_F 7 v_G 6,85	v_F 3 v_G 10,1	v_F 7 v_G 6,85	v_F 3 v_G 10,1
qmm	K_{O_2} 0,594 K_{CO_2} 1,18	k_{O_2} 1,01 k_{CO_2} 1,26	K_{O_2} 0,661 K_{CO_2} 1,25	k_{O_2} 0,949 k_{CO_2} 1,20	K_{O_2} 0,661 K_{CO_2} 1,25	k_{O_2} 0,949 k_{CO_2} 1,20
20′	H (mm) — 6,5	h (mm) + 8,5	H (mm) — 3,0	h (mm) + 8,0	H (mm) + 37	h (mm) + 42,5 ↓ Luft, 10^{-3} n. HCN 20′: + 48,5 mm
	Es war also in 20′: $x_{O_2} = -25{,}2$ cmm $x_S = +41{,}7$ „ (aerob) $x_G = +16{,}5$ „ (anaerob) $x_G = +58$ „ *Meyerhof*-Quotient: 1,65		Es war also in 20′: $x_{O_2} = -21{,}6$ cmm $x_S = +37$ „ (aerob) $x_G = +15{,}4$ „ (anaerob) $x_G = +58$ „ *Meyerhof*-Quotient: 1,98		Es war also in 20′: $x_{O_2} = -7{,}7$ cmm $x_S = +61{,}0$ „ (aerob) $x_G = +53$ „ (anaerob) $x_G = +58$ „ *Meyerhof*-Quotient: 0,65	

Autorenverzeichnis.

Adlersberg, D. und *M. Taubenhaus.* Blutdruck, Blutcholesterin und Diurese nach Zufuhr von Gallensäure. Vorläufige Mitteilung. S. 400.

Barrenscheen, H. K. und *Robert Berger.* Beiträge zum Problem des Blutzuckers. VII. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 5. Insulin. S. 81.

Barrenscheen, H. K., Friedrich Doleschall und *Ludwig Popper.* Beiträge zum Problem des Blutzuckers. III. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 1. Methodik. S. 39.

— — — Beiträge zum Problem des Blutzuckers. IV. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 2. Glucose. S. 50.

— — — Beiträge zum Problem des Blutzuckers. V. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 3. Fructose und Galaktose. S. 67.

— — — Beiträge zum Problem des Blutzuckers. VI. Mitteilung: Blutzucker- und Phosphorsäurekurve. 4. Diabetes. S. 76.

Barrenscheen, H. K. und *Alfred Eisler.* Beiträge zum Problem des Blutzuckers. II. Mitteilung: Die Kurve der alimentären Hyperglykämie. S. 27.

Berczeller, L. und *H. Wastl.* Ernährungslehre und Variationsstatistik. I. Mitteilung: Über die chemische Zusammensetzung der Weizenkörner. S. 168.

— — Ernährungslehre und Variationsstatistik. II. Mitteilung: Über die Korngröße und das Hektolitergewicht des Weizens. S. 181.

— — Ernährungslehre und Variationsstatistik. III. Mitteilung: Über den Cellulosegehalt der Weizenkörner. S. 190.

Berger, Robert s. *H. K. Barrenscheen.*

Bergmann, Max, Arthur Miekeley und *Erich Kann.* Über verschiedene Typen von Aminosäureanhydriden und ihr Verhalten gegen Gerbstoffe und Farbstoffe. S. 1.

Doleschall, Friedrich s. *H. K. Barrenscheen.*

Eisler, Alfred s. *H. K. Barrenscheen.*

Farkas, G. und *H. Tangl.* Das Verhalten des Farbstoffs im Blute bei entmilzten Hunden. S. 135.

Fleisch, Alfred. Die Doppelbestimmung als Genauigkeitsmaß bei quantitativen Analysen. S. 375.

— Die Genauigkeit der Bangschen Mikro-Blutlipoidbestimm. S. 453.

— Die hormonale Beeinflussung des Blutfettgehalts. S. 461.

Forssman, J. Die Abhängigkeit der Wassermannreaktion von den Globulinen. S. 243.

Frank, E., M. Nothmann und *E. Hartmann.* Bemerkungen zu der Arbeit von *A. Grevenstuk* und *E. Laqueur*: Glykogengehalt der Leber unter Insulinwirkung. II. S. 132.

Galwialo, M. J. Über das Ferment des Menschen- und Pferdeblutes und das Ferment der Keimscheibe des Hühnereies. S. 266.

Glaser, Erhard u. *Georg Halpern.* Über Aktivierung von Insulin. S. 196.

Glusmann, M. P. Über die Adsorptionsfähigkeit der Erythrocyten u. d. Diphtherie-immunität. S. 309.

Grafe, V. und *H. Magistris.* Zur Chemie und Physiologie der Pflanzenphosphatide. IV. Mitteilung: Über den Zusammenhang von Vitaminwirkung und Oberflächenaktivität der Phosphatide S. 16.

Gutbier, A. † und *Berta Ottenstein.* Eine Vorrichtung zur Dialyse von leicht oxydablen kolloid-dispersen Systemen. S. 249.

Halpern, Georg s. *Erhard Glaser.*

Hartmann, E. s. *E. Frank.*

Henning, Nobert und *Werner Schaefer.* Untersuchungen über Photoaktivität. S. 109.

Hessel, Georg. Untersuchungen über das Schicksal des Cadmiums nach parenteraler Einverleibung. S. 146.
Hirai, Kinsaburo. Über die Synthese des d, l-2, 4-Dioxyphenylalanins (d, l-Resorcylalanins). S. 449.
Iwasaki, Ken. Untersuchungen zur Frage der „Neoglucose". S. 10.
Juliusburger, Franz s. *L. Pincussen.*
Kann, Erich s. *Max Bergmann.*
Kaufmann, E. Die interferometrische Methode der Abderhaldenschen Reaktion u. interferometrische Analyse fermentativer Prozesse. S. 206.
Kleinmann, H. Nephelometrische Untersuchungen über fermentative Eiweißspaltung. VI. Mitteilung: Zur Kinetik der tryptischen Spaltung. S. 89.
— s. *P. Rona.*
Lenk, Emil. Quantitative Bestimmung der Gelatine. S. 434.
Liesegang, Raphael Ed. Die Permeabilität der Kollodiummembranen. S. 239.
Löw, A. Zur Methodik der Neutralfettbestimmung im Blute nach *Ivar Bang.* S. 144.
Ludwig, Oskar s. *August Rippel.*
Magistris, H. s. *V. Grafe.*
Matsumoto, Buichiro. Über die Wasserstoffionenkonzentration u. das Säurebindungsvermögen der Muttermilch bei Säuglingskakke. S. 118.
Miekeley, Arthur s. *Max Bergmann.*
Niethammer, Anneliese. Zur Frage des Lichttreibens. S. 418.
Nothmann, M. s. *E. Frank.*
Ottenstein, Berta s. *A. Gutbier* †.
Ozaki, Junichi. Über den relativen Nährwert der synthetischen Fette. S. 156.
Pincussen, Ludwig. Analytische Mitteilungen. V. Von *Franz Juliusburger.* Über die nephelometrische Bestimmung der Phosphate. S. 140.
Popper, Ludwig s. *H. K. Barrenscheen.*
Pringsheim, Hans und *Margot Winter.* Über das Komplement der Amylasen (V) und die Zucker-Eiweißkondensation. S. 406.
Redina, L. Über die Wechselwirkung der $Na^{\cdot}$-, $K^{\cdot}$- und $Ca^{\cdot\cdot}$-Ionen in ihrem Einfluß auf das Gewicht der Tiere bei künstlicher Ernährung. S. 253.
Rippel, August und *Oskar Ludwig.* Untersuchungen über physiologische Gleichgewichtszustände bei Pflanzen. Verlauf der Trockensubstanzerzeugung und Stickstoffaufnahme bei Helianthus annuus L. unter verschiedener Höhe der Stickstoffversorgung. S. 318.
Rona, P. und *H. Kleinmann.* Zur nephelometrischen Methodik der Trypsinbestimmung. S. 107.
Schaefer, Werner s. *Norbert Henning.*
Schmidt, A. A. s. *G. E. Wladimiroff.*
Schretter, Gottfried. Der spezifische Brechungszuwachs des Gesamteiweißes im Blutserum. S. 335.
— Der spezifische Brechungszuwachs von Serumalbumin und Serumglobulin. S. 349.
Tangl, H. s. *G. Farkas.*
Taubenhaus, M. s. *D. Adlersberg.*
Täufel, Kurt und *Carl Wagner.* Über die Pufferung in homogenen und heterogenen Systemen. S. 389.
Wagner, Carl s. *Kurt Täufel.*
Warburg, Otto. Über die Wirkung des Kohlenoxyds auf den Stoffwechsel der Hefe. S. 471.
Wastl, H. s. *L. Berczeller.*
Winter, Margot s. *Hans Pringsheim.*
Wladimiroff, G. E. Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. I. Mitteilung: Einige physikalisch-chemische Veränderungen des Eiereiweißes sich entwickelnder Hühnereier. S. 280.
Wladimiroff, G. E. und *A. A. Schmidt.* Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. II. Mitteilung: Zucker-, Rest- und Gesamtstickstoffgehalt im Eiereiweiß sich entwickelnder Hühnereier. S. 298.
— — Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. III. Mitteilung: Zucker-, Fett- und Reststickstoffgehalt im Blute des Hühnerembryos. S. 304.

STACKS

141752

STACKS

141752